

Università degli Studi di Napoli “Federico  
II”



Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate

Dottorato di Ricerca in Morfologia Clinica e  
Patologica  
XXVI Ciclo

*Coordinatore: Prof.ssa Stefania Montagnani*

***Determinanti di aggressività nel melanoma  
cutaneo***

**Tutor**

Ch.ma Prof.ssa  
Stefania Staibano

**Candidato**

Dott.ssa Maria Siano

Anno Accademico 2013-2014

## **INDICE**

### **I. INTRODUZIONE**

1.1 Il melanoma: cenni di epidemiologia e terapia	1
1.2. Background	3
1.3 Regolazione del ciclo cellulare e melanoma	3
1.4 Il fotodanno nella genesi del melanoma	7
1.5 L' ipossia nella modulazione dell' aggressività tumorale	9
1.6 Il modello delle Cancer Stem cells (CSCs) nella melanomagenesi	10

### **II. SCOPO**

### **III. MATERIALI E METODI**

3.1 Popolazione studio	13
3.2 Immunoistochimica	14
3.3 Valutazione presenza mutazioni di BRAF in v600E	15
3.4 Analisi statistica	16

### **IV. RISULTATI**

4.1 Espressione di BRAF nella popolazione studio	17
4.2 Espressione di proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cell	17
4.3 Espressione dei markers di staminalità nella popolazione studio	18
4.4 Espressione della proteina CAIX nella popolazione studio	19
4.5 Espressione delle proteine testate nei casi di melanoma gigante	20
4.6 Analisi statistica	20

<b>V. DISCUSSIONE</b>	22
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	29
<b>FIGURE</b>	41
<b>TABELLE</b>	52

## I. INTRODUZIONE

### *1.1 Il melanoma: cenni di epidemiologia e terapia*

Il melanoma (CMM) pur costituendo solo il 4% dei tumori cutanei, rappresenta la neoplasia più aggressiva e letale tra quelle a insorgenza in questo distretto anatomico (Tsao H et al, 2004), nonchè uno dei più temibili tumori solidi maligni dell'uomo, con un trend d'incidenza che continua a crescere più rapidamente rispetto a quello di ogni altro tipo di tumore (3-7% per anno, a livello mondiale) (Mackie et al, 2009; Howlader N et al, 2013; Simard EP et al, 2012). Negli USA, per il 2014, sono previste 76100 nuove diagnosi di melanoma (di cui 63770 lesioni in situ) e 9710 morti (Siegel R et al, 2014). Nel decennio 2001-2010, si è registrato un incremento del numero di morti per melanoma, soprattutto nel sesso maschile (Siegel R et al, 2014), in controtendenza a quanto documentato per altri “big killers”, quali il carcinoma della mammella, della prostata e del colon-retto.

L'ultimo rapporto GLOBOCAN, relativo ai dati ottenuti da 20 paesi (aree industrializzate ed in via di sviluppo), riporta 197.000 nuove diagnosi di melanoma (collocando il CMM all'11° ed al 9° posto tra le neoplasie per gli uomini e le donne, rispettivamente, con 46000 morti per malattia, con lieve prevalenza nel sesso maschile) (GLOBOCAN 2008).

In Italia, nell'ultimo decennio, il CMM ha rappresentato l'1,6% di tutti i tumori diagnosticati fra gli uomini e il 2,1% nelle donne (in media, 12,5/100.000 per gli uomini e 13,1/100.000 per le donne), causando lo 0,9% del totale dei decessi per neoplasia nel sesso maschile e l'1,0% in quello femminile. E' un tumore che interessa sempre di più le classi d'età più giovani: in oltre il 50% dei casi, viene diagnosticato entro i 59 anni. Il rischio cumulativo di sviluppare un melanoma cutaneo nel corso della vita (fra 0 e 74 anni) è di 8,4‰ fra i maschi (1 caso ogni 119 uomini) e di 8,1‰ fra le femmine (1 caso ogni 123 donne); il rischio di mortalità per tale neoplasia è di 1,9‰ fra i maschi e 1,1‰ fra le femmine.

In Italia, nel corso degli ultimi decenni, l'incidenza del CMM è quasi raddoppiata, mentre la mortalità è rimasta sostanzialmente stabile (AIRTUM 2006).

Questa divergenza può essere spiegata, in parte, da una maggiore informazione e sensibilizzazione della popolazione, attraverso campagne mirate, e da un miglioramento delle tecniche diagnostiche con una diagnosi sempre più precoce, che ha consentito l'identificazione delle lesioni in una fase iniziale di sviluppo (lesioni "sottili"). L'entità dell'infiltrazione cutanea (spessore sec. Breslow) correla infatti con tempo libero da malattia e sopravvivenza. L'ultimo aggiornamento delle procedure di stadiazione dell'AJCC riporta un range di sopravvivenza a 10 anni compreso fra il 92% per CMM di spessore <1 mm ed il 50% per quelli  $\geq 4$  mm (Mandalà M and Voit C, 2013), confermando che l'escissione precoce del melanoma è la migliore strategia per ridurre la mortalità ad esso correlata.

I pazienti con melanoma metastatico hanno infine una probabilità di sopravvivenza a 5 anni compresa fra lo 0 ed il 30%, con una sopravvivenza media di 6-12 mesi (Alonso SR et al, 2004; Mackie RM et al, 2009). Per i pazienti in stadio III sec AJCC, il numero di linfonodi metastatici, la presenza di ulcerazione e la presenza di satellitosi o metastasi in-transit sono i criteri maggiormente predittivi di peggiore prognosi (Fusi et al, 2010).

Fino al 2011 le sole terapie approvate dalla FDA per il melanoma metastatico erano costituite dalla dacarbazina (DTIC) e dall'interleuchina 2 ad alte dosi. Recentemente, sono stati introdotti due nuovi farmaci, ipilimumab (anti - CTLA4) e vemurafenib (B-Raf inhibitor). Tuttavia, in trials clinici, l'ipilimumab aumenta la sopravvivenza di soli 4 mesi, con importanti effetti collaterali, mentre il vemurafenib di circa 1.7 mesi (Georgantas RW 3rd et al, 2013). Sebbene essi rappresentino un progresso importante nella concezione della terapia del melanoma avanzato, la loro efficacia è di breve durata e non si osserva nell'intera popolazione di pazienti; pertanto, il melanoma metastatico, ad oggi, rimane, nei fatti, una malattia ancora non curabile. Ciò rende necessario ogni sforzo da parte della comunità scientifica, al fine di una migliore caratterizzazione molecolare in grado di chiarire i tanti aspetti della biologia del melanoma, ancora irrisolti (Georgantas RW 3rd et al, 2013), consentendo il corretto inserimento dei pazienti in definite categorie di rischio (Alonso SR et al, 2004) e più appropriati protocolli di programmazione terapeutica (Mandalà M and Voit C, 2013).

## ***1.2 Background***

Il melanoma cutaneo è caratterizzato da un' etiologia multifattoriale, che riconosce in esposizione solare e suscettibilità genetica come maggiori fattori predisponenti (Alonso SR et al 2004). Gli eventi molecolari alla base della melanomagenesi coinvolgono geni regolatori del ciclo cellulare, dell' apoptosi, segnali di trasduzione e molecole di adesione (Alonso SR et al 2004), sempre più oggetto di bersaglio da parte di anticorpi monoclonali o di piccole molecole inibitrici, nel contesto della “targeted therapy” che, essendo specificamente disegnata sul profilo molecolare delle cellule tumorali, è gravata da una minore tossicità per i tessuti normali (effetto “bystander”), rispetto ai classici agenti citotossici chimici o fisici (Neuzillet C et al, 2014).

Le principali alterazioni molecolari identificate nel melanoma riguardano 3 pathways: attivazione della via RAS-RAF-ERK, inattivazione del pathway p16-CDK4-Retinoblastoma (Rb) ed inattivazione del pathway ARF-MDM2-p53 (Monahan KB et al, 2010).

### ***1.3 Regolazione del ciclo cellulare e melanoma***

Il pathway delle proteine chinasi attivate da mitogeni (MAPK), in condizioni fisiologiche, connette segnali extracellulari, quali fattori di crescita ed ormoni, al nucleo, con conseguente regolazione dell' espressione di geni coinvolti nella proliferazione e differenziazione cellulare e nella sopravvivenza (Raman M et al, 2007; Garnett Mj and Marais R, 2004). Quando un ligando lega il suo recettore sulla membrana plasmatica viene stimolata l' attività di Ras; uno dei principali effettori a valle è la famiglia Raf (che comprende A-Raf, B-Raf e C-Raf) che a sua volta fosforila ed attiva la chinasi Mek che attiva Erk (Lange-Carter CA and Johnson GL, 1994; Marais R et al, 1995; Minden A et al, 1994). Il dominio chinamico di B-Raf in fase di inattività (ipofosforilato) presenta una conformazione caratterizzata da una interazione atipica proteina-proteina tra un loop ricco in glicina ed il segmento di attivazione. Mutazioni che alterano questa interazione mimano la fosforilazione e consentono alla chinasi di acquisire una conformazione attiva. Di conseguenza, queste proteine mutanti

attivano MEK e, in ultima fase, portano alla costitutiva attivazione di ERK (Davies H et al, 2002). Il pathway Ras – Raf – Mek - Erk è stato implicato nella cancerogenesi umana (Wellbrock C et al, 2004; Gschwind A et al, 2004; Young A et al, 2009; Downward J, 2003) e mutazioni in proteine che ne fanno parte sono considerate mutuamente esclusive. Mutazioni di BRAF sono state descritte nell' 8% dei tumori umani ed in circa il 50% dei melanomi (Mandalà M and Voit C, 2013). Più dell' 80% delle mutazioni, nel melanoma, contempla l' alterazione in un singolo aminoacido (V600E e V600K). BRAF-V600E stimola costitutivamente i segnali cellulari, la proliferazione (indipendentemente dai fattori di crescita) e la trasformazione di melanociti immortalizzati, consentendo alle cellule di crescere come “tumori” (Davies H et al, 2002). Tuttavia, questa mutazione è presente anche in più dell' 80% dei nevi (Pollock PM et al, 2003) e induce la senescenza oncogene-indotta sia in vitro che in situ (Gray-Schopfer VC et al, 2006; Michaloglou C et al, 2005). Questi dati indicano che la mutazione BRAFV600E, da sola, non è in grado di indurre il melanoma e che alterazioni genetiche e/o epigenetiche aggiuntive sono richieste per indurre la trasformazione dei melanociti. La senescenza cellulare, indotta da mutazioni di BRAF, deve essere superata da eventi cooperativi, quale la perdita di oncosoppressori (ad es: p16 e p53) (Yu H et al, 2009; Dankort D et al, 2007; Dankort D et al, 2009).

Le mutazioni dell' oncogene Ras sono descritte nel 20% dei melanomi; coinvolgono principalmente N-Ras e interessano principalmente Gly-12, Ala-18 e Gln-61 (nel 12%, 5% e 70% dei casi rispettivamente) (Hocker T and Tsao H, 2007). Un' elevata frequenza di mutazioni in Ras è stata descritta in relazione all' esposizione solare, nei melanomi nodulari e nei casi familiari (Daniotti M et al, 2004).

Le cellule normali hanno un potenziale limitato di proliferare, superato il quale smettono irreversibilmente di proliferare. Questo processo è stato definito “senescenza replicativa” o “fenomeno di Hayflick”, dal nome del primo studioso che l' ha descritto, ed è il risultato del progressivo “shortening” dei telomeri durante ogni divisione cellulare. Contrariamente all' apoptosi, la senescenza replicativa rappresenta una condizione stabile, di lunga durata, in cui le cellule restano metabolicamente attive per lunghi periodi di tempo (Houben R et al, 2009). Tuttavia, le cellule possono andare incontro ad una più rapida senescenza in risposta a vari stress fisiologici, processo definito “senescenza indotta dallo stress” che include la senescenza indotta da oncogeni (Bartek J et al, 2007; Mooi WJ and Peeper DS, 2006; Yaswen P and Campisi J,

2007). La senescenza è oggi considerata una barriera cruciale per la tumorigenesi e si accompagna ad una serie di alterazioni morfologiche e funzionali: la cellula diventa più grande ed appiattita e subisce una serie di modifiche nella struttura cromatinica e nell'espressione genica (Ha L et al, 2008). Basandosi sulle conoscenze relative al processo della senescenza cellulare, è stato proposto un modello di progressione del melanoma: i nevi (benigni) sono cloni di melanociti che proliferano in seguito alla mutazione di un oncogene per poi arrestarsi in seguito all'attivazione del processo di senescenza. Lo step successivo è il nevo displastico, che rappresenta il risultato del superamento della senescenza o di anomalie cromosomiche. Lo stadio finale è lo sviluppo della fase verticale di crescita che costituirebbe l'esito di mutazioni in pathways che regolano l'apoptosi (Ha L et al, 2008). P53 e Rb giocano un ruolo centrale nella induzione della senescenza cellulare, durante la quale risultano entrambe attivate. A sua volta, un locus centrale nel controllo della senescenza, a monte di p53 e Rb, è il CDKN2, localizzato sul cromosoma 9p21. E' stato associato a vari tipi di neoplasia ed è il più conosciuto locus associato sia al melanoma sporadico che a quello familiare. Codifica per tre oncosoppressori, Ink4a, Ink4b e p14ARF (Bennett DC, 2008; Chin L et al, 2006; Kim WY and Sharpless NE, 2006; Sherr CJ, 2004). I primi due sono inibitori del complesso ciclina D1/CDK4/6 e pertanto attivatori di Rb; Arf lega ed inattiva MDM2, con conseguente attivazione di p53 (Ha L et al, 2008).

#### **- 2.1.1 Il pathway Rb nel melanoma**

P16, le cicline D, i loro partern CDK4/CDK6 e pRb sono gli elementi costitutivi del pathway che regola la fase G1 del ciclo cellulare e che risulta comunemente alterato nella cancerogenesi, in generale, e nella melanomagenesi in particolare; pressocchè tutte le linee cellulari di melanoma presentano alterazioni che consistono o nella perdita di p16 o di pRb, o in mutazioni di CDK4 o nella overespressione della ciclina D1 (Alonso SR et al, 2004; Bartkova J et al, 1996; Castellano M et al, 1997; Walker GJ et al, 1998).

La proteina p16 appartiene alla famiglia INK4 (inibitori di cdk4). Legandosi a CDK4/6 inibisce la formazione del complesso enzimatico con la ciclina D1, richiesto per la fosforilazione di pRb, impedendo il rilascio del fattore di trascrizione E2F, che ha la capacità di attivare i geni necessari per la



progressione del ciclo cellulare attraverso la fase G1 (Weinberg RA, 1995). Pertanto, un' alterazione in questo pathway può portare ad un vantaggio di crescita ed, eventualmente, alla tumorigenesi (Maelandsmo GM et al, 1996)

Una graduale perdita di p16 è stata descritta sia nel melanoma sporadico che in quello familiare, mentre la sua espressione non è alterata nei nevi (Reed JA et al, 1995; Sparrow LE et al, 1998; Keller-Melchior R et al, 1998). Inoltre, è stata osservata un' associazione tra l' espressione della proteina e la localizzazione anatomica della lesione; in un unico studio, la proteina è risultata assente o solo localmente espressa nei melanomi del tronco e delle estremità rispetto a quelli della regione testa – collo (Straume O and Akslen LA, 1997). E' stata descritta anche un' associazione tra la perdita di espressione della proteina e lo spessore, la proliferazione cellulare e il livello di Clark, così come con un comportamento biologico più aggressivo; ma non esistono, ad oggi, dati conclusivi (Li W et al, 2006).

La ciclina D1 è una proteina nucleare codificata dal gene CCND1, localizzato sul cromosoma 11q13. E' un importante regolatore positivo della transizione G1-S del ciclo cellulare, contribuendo alla fosforilazione ed alla inattivazione di pRb. E' stata descritta come amplificata e/o overespressa nel carcinoma della mammella e nel carcinoma squamoso (Maelandsmo GM et al, 1996) e recenti studi hanno dimostrato che può cooperare come oncogene nella trasformazione maligna delle cellule (Li W et al, 2006). Il suo ruolo nella melanomagenesi è meno definito; tuttavia l' amplificazione del gene è stata riscontrata nel 47% di melanomi primitivi e nel 35% di lesioni metastatiche. In diversi studi, condotti mediante indagine immunoistochimica, è stata descritta un' aumentata espressione di ciclina D1 in melanomi cutanei e uveali, mentre nevi benigni e/o melanociti normali dell' epidermide perilesionale mostravano assente o solo focale positività (Li W et al, 2006).

pRb è una proteina nucleare che agisce come “controllore” della fase G1, impedendo alle cellule di entrare in fase S. Nella sua forma attiva risulta ipofosforilata e lega il fattore di trascrizione E2F, impedendo la trascrizione di geni necessari per la progressione attraverso il ciclo cellulare (Brehm A et al, 1998). Mutazioni di Rb sono rare nel melanoma; tuttavia, può esserci una inattivazione funzionale lungo il pathway che può spiegare il suo ruolo nella melanoma genesi (Brantley MA Jr and Harbour JW, 2000 e 2000 bis). Tra i meccanismi che portano all' inibizione di pRb sono contemplati una marcata fosforilazione da parte di Cdk deregolate, mutazioni (omozigoti) del gene rb o

sequestro della proteina da parte di proteine trasformanti (quale la proteina E7 del Papillomavirus) (Li W et al, 2006).

### **- 2.1.2 Il pathway p53 nel melanoma**

Il pathway p53 gioca un ruolo fondamentale nella soppressione/sviluppo del melanoma. In risposta a danni al DNA, la forma wild-type della proteina è implicata nell'arresto del ciclo cellulare, che consente di riparare il DNA o, in alternativa, induce l'apoptosi, attraverso l'inattivazione delle CDKs (el-Deiry WS et al, 1993; Li R et al, 1994). In condizioni normali, p53 è "dormiente" e viene attivata da danni al DNA o da altre aberrazioni genomiche, in seguito ai quali attiva proteine a valle, quale p21, per arrestare il ciclo cellulare. In alternativa, se il danno è troppo severo, viene indotta l'apoptosi (Li W et al, 2006). La perdita della funzione di p53 consente una ripetuta replicazione delle cellule con DNA danneggiato, con conseguente accumulo di alterazioni genetiche che contribuiscono alla progressione neoplastica (Darnton SJ, 1998). L'arresto del ciclo cellulare indotto da p53 è mediato da p14(Arf); Arf trasmette il segnale di stress all'MDM2 che rilascia p53 che viene fosforilata e stabilizzata, con conseguente accumulo della proteina e l'arresto in fase G1 (Li W et al, 2006). Nel melanoma, diversi studi hanno descritto una prevalenza di alterazioni del gene tp53 con percentuali variabili dal 1 al 29% nelle lesioni primitive e dall'11 al 29% in quelle metastatiche. Le mutazioni potrebbero essere UV - correlate; infatti Straume et al hanno descritto un'espressione di p53 maggiore nelle lesioni di siti cronicamente esposti al sole, quali testa-collo, rispetto ad altre sedi (Straume O and Akslen LA, 1997). Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che l'espressione della proteina aumenta gradualmente con la progressione tumorale, indicando che potrebbe rappresentare un evento tardivo nella melanomagenesi.

### ***1.4 Il fotodanno nella genesi del melanoma***

Le radiazioni ultraviolette, ed in particolare gli UV-B, provocano una serie di effetti che vanno dall'eritema alle ustioni alla soppressione della risposta immunologica all'invecchiamento precoce e alle neoplasie cutanee (Abd Elmageed ZY et al, 2009). Il ruolo causale degli UV nella genesi del melanoma è sostenuto da lungo tempo, sebbene vi sia una maggiore

evidenza per l' induzione di neoplasie cutanee diverse dal melanoma, la cui distribuzione riflette le aree di maggiore esposizione alle radiazioni (Williams M and Ouhtit A, 2005). Studi epidemiologici che suggerivano un link tra esposizione solare e melanoma sono stati pubblicati, per la prima volta, in Australia nel 1956 (Whiteman DC et al 2001); in una revisione del 1992, l' agenzia internazionale per la ricerca sul cancro concluse che “c'è sufficiente evidenza nell' uomo per un ruolo delle radiazioni solari nella carcinogenesi del melanoma” (IARC, 1992). Tuttavia, contrariamente agli altri tumori cutanei, che sono associati ad un effetto cumulativo dell' esposizione agli UV, il melanoma sembra legato ad esposizioni intense, ma intermittenti, soprattutto durante l' infanzia (Williams M and Ouhtit A, 2005).

Nella cute, l' assorbimento di UV da parte del DNA delle cellule dell' epidermide e il ri - arrangiamento di elettroni portano alla formazione di fotoprodotto ai siti pirimidinici adiacenti e un danno non riparato può provocare mutazioni genetiche che sono, di solito, una sostituzione C-T o CC o TT, considerati come “UV molecular signature”. Le mutazioni UV-indotte più importanti si verificano in geni oncosoppressori, ed in particolare in p16 e p53 (Brash DE et al, 1991; Peris K et al, 1999). Studi recenti hanno identificato i componenti del pathway Rb (organizzato nei due pathways p16/Rb e p14/p53) come i principali targets del danno da UV nella melanomagenesi (Williams M and Ouhtit A, 2005).

La relazione tra p16 e melanoma è stata dedotta dall' osservazione che i raggi UV possono indurre l' espressione della proteina nella cute, sottintendendo un ruolo nel riparo del danno al DNA indotto da radiazioni. In cellule irradiate con basse dosi di UV-B, si osserva una up-regolazione di p16 nel giro di 12-24 ore che provoca l' arresto del ciclo cellulare per consentire il riparo del DNA (Pavey S et al, 1999; Chazal M et al, 2002; Milligan A et al, 1998). L' effetto delle radiazioni UV su p53 è ben documentata. In seguito ad irradiazione acuta con UV, si osserva un incremento di p53, dopo circa 12 ore, con attivazione di p21, arresto del ciclo cellulare e riparo del danno al DNA. Se il danno è severo, viene indotta l' apoptosi p53-mediata o non (Ouhtit A et al, 2000; Hill LL et al, 1999; Qin JZ et al, 2002; Bowen AR et al, 2003).

Inoltre, l' esposizione acuta o cronica alle radiazioni ultraviolette provoca la produzione di specie reattive dell' ossigeno (ROS) nella cute, che possono contribuire allo sviluppo di neoplasie, incluso il melanoma.

Jenkins et al hanno investigato il ruolo della p16 nella regolazione dei ROS ed hanno descritto che multipli tipi cellulari mostrano un incremento dei livelli di ROS in assenza di p16; livelli che si riducono non appena viene reintegrata la proteina. La regolazione avviene indipendentemente da Rb e da potenziali effetti sul ciclo cellulare. Pertanto, la funzione di p16 potrebbe andare oltre il controllo del ciclo cellulare ed includere un nuovo ruolo nella regolazione dello stress ossidativo nelle cellule della cute ( Jenkins NC et al, 2011).

### ***1.5 L' ipossia nella modulazione dell' aggressività tumorale***

Durante la crescita dei tumori solidi, sottopopolazioni di cellule tumorali e stromali sono esposte a condizioni che variano in relazione all' apporto di ossigeno, nutrienti e fattori di crescita da parte di una vascolarizzazione inadeguata, in relazione allo spazio limitato dal tessuto normale circostante, ad un' elevata pressione interstiziale, a rifiuti metabolici ed altri fattori. Queste condizioni esitano nello sviluppo di un' elevata eterogeneità nell' ambito del tessuto tumorale con un microambiente caratterizzato da regioni di ipossia e/o acidosi (Fang et al., 2008; Gatenby and Gillies, 2008; Gillies et al., 2012). L' ipossia è un fenomeno ampiamente studiato in quanto biologicamente e clinicamente importante, con pronunciati effetti sul fenotipo e sulla progressione tumorale, al punto tale che la chiara connessione con la scarsa prognosi e la resistenza alle terapie convenzionali ha già portato a regimi terapeutici modificati (Chitneni SK et al, 2011; Lin A and Hahn SM, 2012).

Una condizione di ipossia, clinicamente rilevante, è riscontrata in circa il 50% dei tumori solidi, indipendentemente dalle loro dimensioni o istotipo (Vaupel P et al, 2004). Gioca un ruolo fondamentale nell' induzione della instabilità genomica, della capacità di invasione e di metastatizzazione e di un comportamento biologico sfavorevole (Harris AL, 2002; Le QT et al, 2004). Può servire come una “selezione naturale” nell' ambito della popolazione neoplastica, in quanto induce apoptosi nelle cellule sensibili mentre favorisce la sopravvivenza in quelle che hanno perso il loro potenziale apoptotico (Graeber TG et al, 1996). L' ipossia ritarda la progressione delle cellule attraverso il ciclo cellulare consentendo poi una rapida “ripopolazione” appena sopravvengano condizioni migliori; le

cellule che conservano la capacità proliferativa in condizioni ipossiche possono, pertanto, rappresentare un' importante popolazione clonogenica responsabile del fallimento delle terapie (Hoogsteen IJ et al, 2007).

L' attivazione di HIF1 e HIF2 (fattori inducibili dall' ipossia) e di GLUT1 rappresenta la risposta immediata delle cellule tumorali all' ipossia (Teicher BA, 2009; Jubb AM, 2010). Un ulteriore fenomeno è l' overespressione dell' anidrasi carbonica IX (CA IX) sulla membrana delle cellule ipossiche. CA IX è una proteina dimerica transmembrana, che appartiene alla famiglia dei metallo-enzimi che catalizzano la conversione del diossido di carbonio in bicarbonato e protoni, agendo come un "catalytic converter" che pompando il bicarbonato all' interno delle cellule protegge il citosol da livelli bassi di pH, mentre, mediante l' estrusione dei protoni, contribuisce ad acidificare l' ambiente extracellulare, che esita nella morte delle cellule normali circostanti ed accelera la degradazione della matrice extracellulare favorendo l' invasione e l' abilità metastatizzante delle cellule neoplastiche acido-resistenti (Pastorek J et al, 1994; Supuran CT, 2008; Swietach P et al, 2009; Neri D and Supuran CT, 2011; Fang J et al, 2008).

CA IX, inoltre, favorisce l' acquisizione di un fenotipo staminale modulando le adesioni cellulari E-caderina mediate, interferendo con il loro legame alle beta-catenine, e portando alla transizione epitelio-mesenchimale (Shin HJ et al, 2011). Recentemente è stata descritta la possibile relazione tra CA IX e CSCs, che normalmente risiedono nelle regioni ipossiche. Inoltre, pathways bersaglio di CAIX (quali mTORC1, Notch1 e jagged1) sono tra i maggiori regolatori delle funzioni delle cellule staminali e induttori della staminalità (Lock FE et al, 2012).

Ilardi et al, in un recente lavoro, hanno dimostrato una stretta associazione tra over-espressione di CAIX ed i markers di staminalità CD44 e nestina in diverse neoplasie aggressive e metastatizzanti, con una particolare rilevanza in una serie di carcinomi squamosi della lingua (Ilardi G et al, 2013).

### ***1.6 Il modello delle cancer stem cells (CSCs) nella melanomagenesi***

Il melanoma è l' esempio ideale clinico - patologico di neoplasia che si adatta al modello delle CSCs. In una fase precoce di sviluppo, cresce come una lesione piana, non tumorigenica (fase radiale di crescita), virtualmente incapace di sviluppare metastasi. Tuttavia, quando la crescita diventa

invasiva, la lesione acquista la capacità di sviluppare metastasi a distanza, in grado di crescita espansiva autonoma. Il modello delle CSCs si riferisce a diverse sottopopolazioni di cellule maligne e il melanoma, per definizione, mostra “policlonalità”, caratterizzata da una molteplicità di compartimenti architetturali, citologici ed immunoistochimici nell’ ambito di un singolo nodulo neoplastico (Laga and Murphy, 2010). Questo “patterning” e l’ apparente compartimentalizzazione sono consistenti con una gerarchia tra sottopopolazioni di cellule neoplastiche che differiscono tra loro per la capacità di iniziare e mantenere la tumorigenesi attraverso il self-renewal (Maniotis AJ et al, 1999).

Inoltre, il melanoma, tra le neoplasie umane, è altamente “immunogena” e induce due tipi di risposta, una diretta contro la componente più superficiale di lesione (definita regressione), l’ altra diretta contro la quota invasiva profonda (definita “linfociti infiltranti il tumore/TIL) che, insieme, dovrebbero “polverizzare” la lesione; ma il successo è in genere solo parziale, con una porzione del tumore residua che sembra costituita da cellule “impermeabili” ad una altrimenti devastante risposta immunitaria dell’ ospite. Questo aspetto ha suggerito la possibilità che ci siano sottopopolazioni di cellule di melanoma che esprimono molecole che le proteggono dalle cellule T citotossiche o, in alternativa, che non esprimono antigeni melanoma-associati (Schatton T and Frank MH, 2008; Schatton T et al, 2010).

Una volta che il melanoma ha metastatizzato, è estremamente difficile da trattare; ciò è dovuto, in gran parte, alla resistenza ai farmaci che, nella sottopopolazione staminale, è legata all’ espressione di pompe di efflusso sulla membrana cellulare, in grado di espellere gli agenti citotossici.

Con il termine “transizione epitelio-mesenchimale” (EMT) si intende l’ abilità delle cellule epiteliali, nei tumori, di acquisire un fenotipo mesenchimale. Questo fenomeno è accompagnato da una maggiore aggressività (capacità di invasione e metastatizzazione) e prevede l’ espressione di geni tipici più di un fenotipo mesenchimale che epiteliale. Il melanoma è capace di passare da una crescita tumorigenica, in cui cellule epitelioidei crescono in maniera coesiva a formare noduli espansivi, a un fenotipo invasivo in cui cellule sottili, fusiformi invadono la matrice extracellulare singolarmente o in piccoli fasci. Considerando che la capacità di passare da una fase all’ altra è responsabile della aggressività delle lesioni, e poiché la fase invasiva è considerata come un pre-requisito per lo

sviluppo di metastasi, il melanoma mostra, sicuramente, aspetti EMT-like che ci inducono a chiederci se derivino dall' espressione di geni mesenchimali e se siano coinvolte le MSCs (Murphy GF et al, 2013).

Ad oggi, rimane una questione aperta se il melanoma origini da cellule staminali mutate o da cellule differenziate che acquisiscono un fenotipo stem-like in seguito a mutazioni, o da entrambe.

## **II. SCOPO**

Valutare, in una serie selezionata di melanomi spessi, mediante indagine immunoistochimica e/o molecolare, l' espressione di proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare e nel DNA-repair (p16, p53, pRb), di markers di staminalità (nestina ed ABCG2), del marker di ipossia CAIX e di mutazioni coinvolgenti il gene BRAF.

Correlazione dei risultati con i dati clinico – patologici e di follow-up, allo scopo di identificare un eventuale pannello di nuovi marcatori predittivi di rischio, valutabili su campioni di tessuto paraffinato di melanoma cutaneo.

### III. MATERIALI E METODI

#### *3.1 Popolazione studio*

Sono stati selezionati dall' archivio della Sezione di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate dell' Università degli Studi di Napoli "Federico II" 55 casi di melanomi spessi (spessore >2 mm sec Breslow), estrapolati dall'intera casistica sulla base della disponibilità dei dati di follow-up. Le caratteristiche principali della popolazione studio sono risultate le seguenti:

23/55 (42%) pazienti donne, 32/55 (58%) uomini;

età media 61,2 anni (range 22-98 anni);

40 casi (73%) localizzati in sedi fotoesposte;

diametro macroscopico medio 1,59 cm (range 0,5-2,5 cm).

Alla valutazione istologica:

29 casi (53%) con ulcerazione ed un caso con residua quota di pregresso nevo;

componente cellulare epitelioidale in 25/55 (45%) casi, fusata in 2/55 (4%), balloon in 1/55 (2%), nevoide in 2/55 (4%) e mista in 25/55 (45%);

tredici/55 (24%) casi nodulari e 8/55 (15%) polipoidi;

in 44/55 (80%) casi era stato effettuato l'esame del linfonodo sentinella, risultato positivo per la presenza di micrometastasi/metastasi parziale in 11/44 casi (25%);

durante il follow-up, 15 pazienti (27%) hanno sviluppato metastasi (linfonodali in 3 casi, a distanza in 5 casi, uno dei quali aveva sviluppato, inoltre, due recidive; in 7 casi, i pazienti hanno sviluppato sia metastasi linfonodali che a distanza: di questi, 4 sono morti per malattia).

L' insieme dei dati clinico-patologici e di follow-up è riportato in Tabella 1.

Sono stati, inoltre, inclusi nello studio 3 casi di melanoma gigante (dimensioni macroscopiche >5 cm), le cui caratteristiche cliniche e patologiche sono riassunte in Tabella 2.



### ***3.2 Immunoistochimica***

Per ogni caso, è stato selezionato un blocchetto di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina, da cui sono state tagliate sezioni di 4 micron di spessore montate su vetrini Superfrost (Microm, Walldorf, Germany) per immunoistochimica. Le sezioni sono state trattate con metodica immunoistochimica standard, dopo sparaffinatura in xilene e reidratazione mediante scala degli alcoli fino all'acqua distillata deionizzata. Successivamente le sezioni sono state trattate con siero bovino diluito all'1% in PBS per 15 min. E' stato utilizzato un sistema di rivelazione in fosfatasi alcalina con inibizione della forma endogena mediante levamisole, allo scopo di minimizzare le reazioni aspecifiche. E' stata, quindi, effettuata l'incubazione overnight a 4 °C con gli anticorpi primari anti – carbonic anydrase IX (CAIX) (clone H120, Santa Cruz Biotechnology, 1:100), nestin (clone 10C2, Santa Cruz Biotechnology, 1:50), ABCG2 (clone 6D171, Santa Cruz Biotechnology, 1:100), anti-Rb (clone E4310, Spring Bioscience, 1:200) e di 1 ora per gli anticorpi anti - p16INK4a (clone E6H4, CIntec Histology kit), anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology sc-47698, mouse monoclonal, clone DO-7, 1:50), anti-BRAF (Spring Bioscience E19290, mouse monoclonal, clone VE-1, 1:100). E' stato successivamente aggiunto un anticorpo secondario biotinilato e della streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina. L'avvenuta reazione è stata evidenziata con il cromogeno fast-red, che ha evidenziato la presenza antigenica da noi ricercata in rosso (Dako REAL Detection System, AlkalinePhosphatase/RED, Rabbit/Mouse). Anche in questo caso, dopo un debole contrasto nucleare con ematossilina, le sezioni sono state poi montate con un mezzo sintetico (Entellan; Merck, Darmstadt, Germany).

In accordo a quanto riportato da precedenti lavori, nella valutazione dell' espressione di Braf abbiamo considerato positive le cellule tumorali che presentavano un chiaro segnale citoplasmatico, con intensità da moderata ad intensa; abbiamo considerato negativi, invece, i casi in cui non era presente immunoreattività, o presentava localizzazione nucleare, o era ristretta a singole cellule isolate o alla popolazione monocito/macrofagica (Borsault L et al, 2013).

Per la valutazione della espressione della nestina è stato considerato positivo un segnale citoplasmatico ed è stato definito positivo o negativo a seconda che la percentuale di cellule neoplastiche positive fosse  $\geq$  o

<10%. Analoga valutazione è stata effettuata per ABCG2, per il quale, però, è stato considerato positivo un segnale di membrana.

Per Rb, p53, p16 è stato considerato positivo un segnale nucleare. Per ogni caso è stata valutata la percentuale di cellule neoplastiche positive sul totale e definita positiva quando è risultata >10%.

### ***3.3 Valutazione presenza mutazioni di BRAF in v600E***

Per la ricerca delle mutazioni del gene BRAF è stato utilizzato il metodo HRM che consiste in un'analisi post-amplificazione che si basa sul comportamento di dissociazione o melting del DNA e che consente di discriminare molecole di DNA eteroduplex da quelle omoduplex. I duplex si formano quando frammenti amplificati di DNA vengono denaturati termicamente e lasciati ricombinare. Una qualsiasi variazione (mutazione o polimorfismo) tra le due forme alleliche di un frammento porta alla formazione di un eteroduplex (combinazione di due catene di DNA a singola catena, non perfettamente corrispondenti, caratterizzata dalla presenza di una "bolla" a livello della quale si trova il mismatch). Per confermare ed identificare la variazione di sequenza è necessario il sequenziamento. Il metodo HRM è vantaggioso perché permette di fare un primo screening alla ricerca di mutazioni o polimorfismi.

Il kit da noi utilizzato (LightMix® Kit BRAF V600E, Roche Diagnostics GmbH) serve ad identificare la mutazione T1799A (V600E) nel gene BRAF mediante l'amplificazione di un frammento di 212 bp con primers specifici e sonde ad ibridazione specifiche marcate con un fluoroforo. I frammenti amplificati avranno una temperatura di melting diversa a seconda che sia presente o meno la mutazione. Dunque, il genotipo viene identificato analizzando una curva di melting e la relativa temperatura di melting ( $T_m$ ). Il mutante BRAF V600E ha una temperatura di melting di 61°C nel canale a 640nm mentre l'amplicone wild-type ha una temperatura di melting di 53°C nel canale a 640nm. Nel kit è compreso un inibitore dell'amplificazione dell'allele wild-type e quindi i campioni wild-type non saranno amplificati e mostreranno una linea di base. Il kit riesce a rilevare anche lo 0.2% di mutanti BRAF V600E dato che è inibita l'amplificazione dell'allele WT. Riguardo alla sensibilità del saggio si possono usare da 50 ng a 1,000 ng di DNA genomico per reazione.

### ***3.4 Analisi statistica***

La correlazione tra le variabili del nostro studio ed in particolare tra l'espressione dei marcatori testati e le varie caratteristiche cliniche e patologiche esaminate, è stata valutata mediante test del chi quadro, cui è stata applicata la correzione di Fisher. La correlazione tra l'espressione dei diversi marcatori è stata valutata mediante il test dei ranghi (di Spearmann). Sono stati considerati significativi valori di  $p < 0,05$ .

Le curve relative al tempo libero da malattia e di sopravvivenza sono state generate con il metodo di Kaplan Meyer; la significatività statistica delle curve è stata calcolata mediante log - rank test.

Per l'analisi sono stati utilizzati il programma Microsoft Excel 2010 ed il software MedCalc version 13.1.

## IV. RISULTATI

### *4.1 Espressione di BRAF nella popolazione studio*

#### *Immunocolorazione*

L'immunocolorazione per la proteina è risultata positiva in 45/54 casi (83%). Di questi, 33 (73%) erano localizzati in sedi foto esposte; 31 (69%) casi erano SSM e 14 casi nodulari/polipoidi; 23 casi (51%) presentavano ulcerazione, 23 un indice mitotico  $\geq 1$  mitosi. La reazione infiammatoria intratumorale nei pazienti con la mutazione è risultata scarsa in 39 casi (87%). In 12 casi l'esame del linfonodo sentinella era risultato positivo per metastasi da melanoma. Alla valutazione del follow – up parziale, la maggior parte dei pazienti non aveva sviluppato una seconda neoplasia cutanea; viceversa, 14/15 casi che avevano sviluppato almeno un evento avverso durante il follow-up erano risultati immunoreattivi per la proteina (93%).

#### *Stato mutazionale*

### *4.2 Espressione di proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare*

#### *- p16*

La proteina è risultata negativa in 30/38 casi (79%). Di questi, 28 (93%) erano localizzati in sedi foto esposte, 11 (37%) presentavano ulcerazione, 16 (53%) un indice mitotico  $\geq 1$ , una reazione infiammatoria intratumorale scarsa in 28 (93%) pazienti, la tipologia era nodulare/polipoide in 9 casi (30%) e tipo SSM in 21 (70%). Il linfonodo sentinella al tempo 0 era risultato positivo in 10 pazienti e negativo in 20. Al follow-up parziale, la maggior parte dei pazienti non aveva sviluppato altre neoplasie cutanee; inoltre, 14/15 pazienti che avevano sviluppato almeno un evento avverso erano risultati negativi per proteina.

- **p53**

L' espressione di p53 è risultata superiore al cut-off in 13/23 (56%) pazienti esaminati. Di questi, 10 (77%) erano localizzati in sedi foto esposte, 7 (54%) presentavano ulcerazione, 7 (54%) un indice mitotico  $\geq 1$  mitosi/mm<sup>2</sup>, tutti una reazione infiammatoria intratumorale scarsa, 5 (38%) una tipologia nodulare/polipoide e 8 (61%) tipo SSM. La valutazione del linfonodo al tempo 0, in questo gruppo di pazienti, aveva mostrato positività per metastasi in 3 (23%) casi e negatività in 7 (54%). Alla valutazione del follow-up parziale, 3 pazienti (n 28, 43 e 44), avevano sviluppato almeno un' altra neoplasia nel corso del follow-up; due di questi pazienti erano risultati positivi per proteina BRAF mutata. Inoltre, 6 (46%) pazienti, in corso di follow-up avevano sviluppato almeno un evento avverso contro 7 pazienti che invece avevano presentato un out come favorevole.

- **pRb**

L' espressione di p53 è risultata superiore al cut-off in 18/27 (67%) pazienti esaminati. Di questi, 14 (78%) erano localizzati in sedi foto esposte, 10 (55%) presentavano ulcerazione, 8 (44%) un indice mitotico  $\geq 1$  mitosi/mm<sup>2</sup>, 17 (94%) una reazione infiammatoria intratumorale scarsa, 5 (28%) una tipologia nodulare/polipoide e 13 (72%) tipo SSM. La valutazione del linfonodo al tempo 0, in questo gruppo di pazienti, aveva mostrato positività per metastasi in 4 (27%) casi e negatività in 11 (73%). Alla valutazione del follow-up parziale, 5 (28%) pazienti (n 12, 27, 28, 34 e 35), avevano sviluppato, una seconda lesione ed erano risultati positivi per proteina BRAF mutata. Inoltre, 6 (33%) pazienti, in corso di follow-up avevano sviluppato almeno un evento avverso contro 12 pazienti che invece avevano presentato un out come favorevole.

**4.3 Espressione dei markers di staminalità nella popolazione studio**

- **Nestina**

La nestina è risultata overespressa in 39/51 (76%) casi esaminati. In 27 (69%) casi si trattava di lesioni localizzate in sedi foto esposte; in 23 (59%)

era presente ulcerazione, in 19 (49%) un indice mitotico  $\geq 1$  mitosi/mmq, ed una reazione infiammatoria intratumorale scarsa in 34 (87%) casi. La tipologia era nodulare/polipoide in 14 (36%) casi, e tipo SSM nei restanti. Al tempo 0, il linfonodo sentinella è risultato positivo in 6 (19%) casi e negativo in 26. Al follow-up parziale, 9 (23%) pazienti (n 12, 14, 20, 28, 29, 34, 43, 44 e 46) avevano sviluppato almeno un' altra neoplasia. Inoltre, 11 (28%) pazienti, in corso di follow-up avevano sviluppato almeno un evento avverso.

#### - **ABCG2**

La proteina è risultata overespressa in 31/52 (60%) casi esaminati. In 23 (74%) casi si trattava di lesioni localizzate in sedi foto esposte; in 21 (68%) era presente ulcerazione, in 16 (52%) un indice mitotico  $\geq 1$  mitosi/mmq, ed una reazione infiammatoria intratumorale scarsa in 27 (87%) casi. La tipologia era nodulare/polipoide in 12 (39%) casi, e tipo SSM nei restanti. Al tempo 0, il linfonodo sentinella è risultato positivo in 6 (23%) casi e negativo in 20. Al follow-up parziale, 6 pazienti (n 14, 25, 27, 29, 43 e 45) avevano sviluppato almeno un' altra neoplasia. Otto pazienti, in corso di follow-up, avevano sviluppato almeno un evento avverso.

#### ***4.4 Espressione della proteina CAIX nella popolazione studio***

La proteina è risultata overespressa in 30/49 (61%) casi esaminati. Di questi, in 20 (67%) casi si trattava di lesioni localizzate in sedi foto esposte; in 15 (50%) era presente ulcerazione, in 12 (40%) un indice mitotico  $\geq 1$  mitosi/mmq, ed una reazione infiammatoria intratumorale scarsa in 25 (83%) casi. La tipologia era nodulare/polipoide in 11 (37%) casi, e tipo SSM nei restanti. Al tempo 0, il linfonodo sentinella è risultato positivo in 5 (19%) casi e negativo in 21. Al follow-up parziale, 12 pazienti (n 2, 12, 20, 25, 27, 28, 34, 35, 44, 46, 49 e 55), avevano sviluppato almeno un' altra neoplasia. Otto pazienti, in corso di follow-up, avevano sviluppato almeno un evento avverso.

*Tutti i risultati ottenuti nella popolazione studio sono riportati in Tabella 3, come valori percentuali, e in Fig.1.*

*In Fig. 2 e Fig. 3 è illustrato il pannello di colorazioni immunoistochimico di due casi, uno con follow-up negativo ed uno con follow-up positivo.*

#### ***4.5 Espressione delle proteine testate nei casi di melanoma gigante***

I tre casi testati sono risultati tutti negativi per proteina p16; i markers di staminalità erano overespressi in tutti i pazienti, con i livelli più elevati in corrispondenza del fronte di invasione; analogamente la proteina CA IX è risultata overespressa a livello cellulare in tutti e tre i casi a livello citoplasmatico, con maggiore intensità in corrispondenza del fronte di invasione, mentre era risultata negativa a livello stromale. L'indagine immunoistochimica per BRAF è risultata positiva in 2/3 casi e negli stessi casi la proteina p53 è risultata negativa (Fig. 4).

*I risultati ottenuti nei casi di melanoma gigante sono riportati in Tabella 3bis.*

#### ***4.6 Analisi statistica***

L'indagine statistica eseguita ha mostrato una correlazione significativa tra espressione di CA IX e basso indice mitotico e tra over espressione di ABCG2 e presenza di ulcerazione. Per tutte le altre associazioni testate è stata osservata una distribuzione delle frequenze la cui significatività statistica è inficiata dalla bassa numerosità del campione, ma che mostra un apprezzabile trend di correlazione.

L'analisi della dipendenza tra i singoli marcatori, basata sul test dei ranghi, ha mostrato una correlazione inversa tra l'espressione dei markers di staminalità e la proteina CA IX nel citoplasma delle cellule di melanoma ed una correlazione diretta tra l'espressione di nestina ed ABCG2, suggerendo la dipendenza tra i due marcatori.

La valutazione delle curve di Kaplan Meyer ha mostrato un intervallo libero da malattia inferiore per i casi overesprimenti nestina, CA IX sia citoplasmatico che stromale, ABCG2, p53 e negativi per proteina p16,

considerando semplicemente l'evenienza di un evento avverso. Valutando il tempo libero di malattia rispetto all' occorrenza di metastasi, si è notata una riduzione nei casi che avevano mostrato positività per CA IX stromale, nestina e pRb e negatività per p16 e p53. Analogamente, valutando la presenza di metastasi linfonodali, si è evidenziata una riduzione del tempo libero da malattia nei casi overesprimenti CA IX sia citoplasmatica che stromale, nestina sia a livello cellulare che endoteliale, p53 e nei casi negativi per proteina p16 e/o esprimenti bassi livelli di ABCG2. Per ognuna di questi fattori, pur in assenza di una conclusiva significatività statistica, si è riscontrato un chiaro trend di associazione (Fig 5 e 5bis, 6 e 6bis, 7 e 7bis).



## V. DISCUSSIONE

Con circa 20.000 morti l'anno in Europa e una mediana di sopravvivenza di circa 7 mesi, il melanoma metastatico rappresenta uno dei principali problemi tuttora irrisolti, in campo oncologico (Boursault et al, 2013). I nuovi agenti terapeutici recentemente acquisiti hanno consentito solo un breve aumento della sopravvivenza dei pazienti con melanoma metastatico, associato, comunque, ad importanti effetti collaterali e/o a comparsa di resistenza (Georgantas RW 3rd et al, 2013).

Il pathway Ras-Raf-Mek-Erk è una delle meglio caratterizzate cascate chinasiche nella biologia del cancro (Neuzillet C et al, 2013). E' innescato da fattori di crescita o mutazioni attivanti chinasi oncogeniche coinvolte in questo pathway. La sua deregolazione è stata descritta in diversi tipi di neoplasie e provoca alterazioni nell'espressione di numerosi geni coinvolti nella differenziazione cellulare, nella proliferazione, nella sopravvivenza, nella capacità di migrazione e di angiogenesi (McCubrey et al., 2007). Mutazioni in questo pathway sono state riscontrate nel 90% dei melanomi e, in particolare, le mutazioni di BRAF coinvolgono il 50% dei melanomi (Mandalà M and Voit C, 2013). La mutazione V600E è la più frequente e provoca l'attivazione costitutiva del pathway con una proliferazione indipendente dai fattori di crescita e la trasformazione dei melanociti immortalizzati. Tuttavia, mutazioni di BRAF sono state descritte anche nell'80% dei nevi, indicando che l'alterazione del pathway, da sola, non è in grado di indurre il melanoma, ma è necessario che siano presenti ulteriori modificazioni genetiche e/o epigenetiche che consentano di superare la senescenza indotta da BRAF(V600E). Le alterazioni più frequentemente associate sono la perdita di geni oncosoppressori, in particolare p16 e p53 (Mandalà M and Voit C, 2013). BRAF(V600E), pertanto, va considerato come un "driver" della melanomagenesi e come un target terapeutico; farmaci diretti contro la proteina mutata sono già in commercio.

L'introduzione nella terapia dei pazienti con melanoma metastatico degli inibitori di BRAF-mutato si è dimostrata efficace nel migliorare la sopravvivenza libera da malattia. Un'accurata e rapida identificazione delle mutazioni della proteina, pertanto, al momento della diagnosi del melanoma metastatico, è essenziale per una terapia ottimale. Ad oggi, i test per l'identificazione della mutazione comprendono metodiche di biologia

molecolare, quali la RT-PCR, pirosequenziamento e sequenziamento di Sanger, usati da soli o in combinazione. Tuttavia queste metodiche richiedono l'uso di materiali e tecniche costose, rigorosi controlli di qualità, nonché personale specializzato (Long GV et al, 2013).

Recentemente è stato sviluppato un anticorpo specifico per la mutazione V600E che consente l'identificazione, mediante immunoistochimica, della protein BRAF mutata con una sensibilità ed una specificità elevate (VE1; Springer-Bio, Maisons- Alfort Cedex, France) (Zagzag J et al, 2013). Nel nostro lavoro, ci siamo avvalsi di questo anticorpo per lo screening di base per la valutazione della presenza della mutazione nella popolazione studio. Nella nostra casistica, la proteina BRAF(V600E) è risultata mutata nell' 83% dei casi, in accordo a quanto descritto in letteratura. Nella maggior parte dei casi la positività era diffusa e solo in 3 casi, invece, presentava una distribuzione "patchy", che noi abbiamo ritenuto espressione della policlonalità della lesione. Dalla valutazione della correlazione della presenza della mutazione con i parametri clinico patologici è emerso che i casi positivi per BRAF presentano una tipologia di crescita tipo SSM, sono nella maggior parte ulcerati e presentano una reazione infiammatoria intratumorale scarsa, rispetto alla controparte negativa; dal punto di vista della evoluzione, nella nostra popolazione, è associata con un comportamento biologico favorevole solo per quanto riguarda l'insorgenza di altre neoplasie cutanee; tuttavia, rispetto ai pazienti BRAF negativi, presentano un numero maggiore di linfonodi sentinella positivi al tempo 0 e una maggiore incidenza di eventi avversi durante il follow-up.

In condizioni normali, il programma di senescenza è iniziato e mantenuto dalla p53 e dal pathway p16-Rb. L' inattivazione di p53 è associata con un' aumentata crescita ed instabilità genomica ed è un segno prognostico sfavorevole nei tumori, essendo associata con una ridotta sopravvivenza e un' aumentato tasso di recidiva (Carson et al, 2012). Tuttavia mutazioni di questa proteina nel melanoma sono rare. Mutazioni puntiformi e delezioni del gene CDKN2A sono state descritte nel 75% dei melanomi; un meccanismo alternativo di silenziamento è la metilazione del promotore. L' assenza della proteina p16 (prodotto del gene CDKN2a) esita in un vantaggio di crescita che può portare alla tumorigenesi (Maelandsmo GM et al, 1996).

Inoltre, l'attività di Rb è il bersaglio chiave delle radiazioni ultraviolette ed è alterato nei tumori cutanei di derivazione epiteliale e nel melanoma. I pathways p16-Rb e p53-Rb, come già descritto, in risposta alle radiazioni intervengono nella regolazione del ciclo cellulare per la riparazione del danno al DNA e nella induzione dell'apoptosi. Alterazioni in queste vie possono compromettere questi meccanismi di difesa e portare allo sviluppo di neoplasie (Kannan K et al, 2003; Outhit A et al, 2000; Williams M and Outhit A, 2005).

Nel nostro studio, la proteina p16, è risultata, come atteso, assente nell'79% dei casi. Dall'analisi della correlazione diretta con i vari parametri valutati è risultata, in linea di massima, l'associazione con un fenotipo più aggressivo caratterizzato dall'ulcerazione, da una scarsa reazione infiammatoria intratumorale, e da un comportamento biologico più aggressivo, rispetto ai casi risultati almeno parzialmente positivi alla proteina (positività del linfonodo sentinella al tempo 0, insorgenza di una seconda neoplasia e occorrenza di almeno un evento sfavorevole in corso di follow-up). Inoltre, tutti i casi p16 negativi, ad eccezione di tre, erano risultati positivi per proteina BRAF mutata, avallando l'ipotesi che la perdita di p16, qualunque sia il meccanismo alla base, è uno step aggiuntivo nella melanomagenesi che consente, nei pazienti BRAF mutati, di evadere la senescenza cellulare. Inoltre, nella nostra popolazione, la maggior parte dei casi negativi per proteina p16 è risultata localizzata in aree fotoesposte. In precedenza, l'associazione tra l'espressione della proteina e la localizzazione anatomica della lesione è stata osservata in un unico studio, in cui è risultata assente o solo localmente espressa nei melanomi del tronco e delle estremità rispetto a quelli della regione testa – collo (Straume O and Akslen LA, 1997). Pertanto, potremmo ipotizzare, in accordo a quanto descritto in precedenza, che l'assenza di proteina p16 sia un fattore predisponente l'insorgenza del melanoma nelle aree foto esposte, in quanto le cellule perdono la capacità di riparare il danno del DNA da UV (Williams M and Outhit A, 2005). In ultima analisi, l'assenza di espressione di proteina p16, ha mostrato una certa associazione con una riduzione dell'intervallo libero da malattia, quando riferito all'occorrenza di un evento avverso generico, di metastasi a distanza e di metastasi linfonodale.

Per quanto riguarda la proteina p53, ha mostrato un trend di correlazione con la localizzazione delle lesioni nelle aree foto esposte, in

accordo a quanto descritto in precedenza da Straume et al in merito ad una maggiore espressione di p53 nelle lesioni di siti cronicamente esposti al sole, quali testa-collo, rispetto ad altre sedi (Straume O and Akslen LA, 1997).

Inoltre, la sua overespressione è stata trovata in associazione ad un elevato indice mitotico, probabile espressione di una forma mutata della proteina, incapace, pertanto, di bloccare il ciclo cellulare, come avviene in condizioni fisiologiche. Tuttavia, l' overespressione della proteina ha mostrato una "associazione inversa" con la positività del linfonodo sentinella al tempo 0; tale dato potrebbe essere il risultato, in questi casi, dell' overespressione di una forma funzionale della proteina che, contrastando la proliferazione incontrollata, potrebbe esercitare un effetto protettivo sulla possibilità di sviluppare metastasi linfonodali.

Recentemente abbiamo dimostrato che la presenza di coespressione di CA IX e di markers di staminalità in carcinomi squamosi del cavo orale è associata ad una maggiore aggressività delle lesioni. Nello stesso lavoro, inoltre, è stata descritta l'associazione tra l' espressione stromale di CA IX e l' aggressività biologica nel carcinoma della prostata e in quello squamoso del cavo orale (Ilardi et al, 2013).

La valutazione dell' espressione immunoistochimica della proteina CA IX nella nostra popolazione ha mostrato overespressione nel 61% dei casi, con i livelli più elevati nelle aree periferiche delle lesioni e in corrispondenza del fronte di invasione. Tale distribuzione può essere attribuibile alla capacità di acidificazione dello stroma che favorisce l' invasione e la migrazione cellulare e che, pertanto, è più evidente sul fronte "libero" della neoplasia. Un' ulteriore spiegazione potrebbe essere data dalla capacità della proteina di alterare le connessioni intercellulari, favorendo il distacco cellulare e la migrazione, processi, anche questi, più pronunciati in corrispondenza del fronte di invasione.

Inoltre, nei casi con ulcerazione, la proteina è risultata localizzata prevalentemente nelle aree perinecrotiche sub ulcerative, in accordo con quanto descritto in letteratura (Giatromanolaki A et al, 2001; Wykoff CC et al, 2000).

Dagli studi della letteratura, è emerso che l' acidificazione extracellulare ad opera di CA IX può essere strettamente associata alla trasformazione tumorigenica, alla distruzione della matrice extracellulare, all' induzione di fattori di crescita cellulare e ad attivazione delle proteasi

(Shin HJ et al, 2011), tutte modificazioni, queste, che favoriscono la progressione tumorale e che noi in precedenza abbiamo dimostrato essere associate ad un comportamento più aggressivo in tumori maligni solidi, quando la proteina era localizzata a livello stromale (Ilardi G et al, 2013). Anche in questo studio, abbiamo valutato l'espressione di CA IX nello stroma delle lesioni, inteso come derma sub- e perilesionale. Abbiamo trovato la proteina espressa a livello stromale in 14 casi e di questi 6, al follow-up avevano sviluppato almeno un evento avverso, due dei quali avevano mostrato metastasi del linfonodo sentinella al tempo 0. Gli altri casi con positività stromale per la proteina avevano presentato metastasi al linfonodo sentinella in 1 caso, altre neoplasie in 3 casi e in 7 casi le lesioni erano ulcerate. Anche nella nostra serie di melanomi, quindi, possiamo riconoscere un trend di associazione tra l'espressione stromale di CA IX ed una maggiore aggressività delle lesioni. Tale associazione è stata poi confermata dalle curve di sopravvivenza che hanno mostrato una riduzione dell'intervallo libero da malattia nei pazienti over-esprimenti CA IX stromale, in relazione all'occorrenza di un evento avverso qualsiasi, di metastasi a distanza e di metastasi linfonodale.

Interessante poi è stato il riscontro della correlazione tra l'espressione di CA IX nel tumore e basso indice mitotico delle lesioni ( $<1$  mitosi/mm<sup>2</sup>); infatti, considerando che l'overespressione della proteina, in associazione ad un microambiente ipossico, è stata correlata all'induzione di un fenotipo staminale, una bassa attività proliferativa nei casi che overesprimono la proteina, potrebbe essere legata all'attivazione della sottopopolazione staminale del tumore che, per sua definizione, ha un basso indice di proliferazione.

Questo aspetto appare di particolare rilievo, ai fini delle considerazioni relative all'assetto molecolare alla base delle divergenze biologiche dei diversi casi di melanoma cutaneo, in quanto si correla direttamente al tema delle cellule staminali tumorali (CSC). Le CSCs, per la loro capacità illimitata di proliferare, di "self-renewing" e di differenziare, sono state associate alla progressione, al potenziale metastatico ed alla cattiva prognosi dei pazienti con melanoma (Lee N et al, 2014).

Nel nostro lavoro abbiamo valutato l'espressione di due marcatori di staminalità, nestina, un neuro filamento espresso durante la vita fetale ma non nell'adulto, nel quale viene riespressa in alcune condizioni patologiche, e ABCG2, una pompa di membrana che espelle metaboliti e

chemio tossici dall' ambiente intra- a quello extracellulare, uno dei principali meccanismi di resistenza alle terapie attivati dalle cellule staminali. Entrambi questi markers sono stati descritti in letteratura come associati ad un comportamento più aggressivo e ad una prognosi peggiore. Nel nostro lavoro è emersa una stretta concordanza di espressione dei due markers nella popolazione esaminata, con gli stessi casi esprimenti livelli elevati delle proteine. Tuttavia, dall' analisi della correlazione con i dati clinici e patologici, la sola correlazione diretta è risultata quella fra CSC e presenza di ulcerazione, forse segno di un possibile meccanismo di adattamento allo stato ipossico. Dall'analisi di sopravvivenza, è emersa inoltre una riduzione del tempo libero da malattia, sia in relazione ad un evento avverso qualsiasi che alla presenza di metastasi a distanza e linfonodali, nei pazienti overesprimenti la proteina nestina, in accordo a quanto descritto precedentemente in letteratura. In particolare, i pazienti che overesprimevano nestina a livello degli endoteli dei vasi neoformati hanno mostrato sviluppo di metastasi linfonodali in un' epoca più precoce rispetto alla controparte normo-esprimente la proteina. Inoltre, dal nostro lavoro, è emersa un' associazione inversa, statisticamente significativa, tra l' espressione dei marcatori di staminalità e di CA IX. Tale dato potrebbe essere riconducibile ad una attivazione della popolazione staminale, in condizioni di bassa espressione di CA IX, da parte di un ambiente ipossico non contrastato efficacemente dai bassi livelli dell' anidasi.

Infine, nella nostra casistica, abbiamo inserito anche tre melanomi giganti che avevano mostrato un comportamento biologico favorevole, con la comparsa recidiva solo in un caso, peraltro localizzato sul cuoio capelluto, che è, per definizione, la sede delle lesioni più aggressive (Ching JA and Gould L, 2012). In linea generale, tutti i melanomi giganti sono risultati negativi per proteina p16 ed over-esprimenti i markers di staminalità testati, con livelli più elevati in corrispondenza del fronte di invasione. Anche la proteina CA IX è risultata overespressa nel tessuto tumorale, in maniera più evidente in corrispondenza del fronte di invasione. Nessuno dei casi ha mostrato positività stromale per la proteina. Il caso n° 3G, che ha sviluppato recidiva, a differenza degli altri due casi ha mostrato incremento dell' espressione di p53 e negatività per proteina BRAF-mutata. Cio' potrebbe indicare un meccanismo di tumorigenesi indipendente da mutazioni di BRAF ma coinvolgenti la proteina p53, in accordo con la

descritta associazione tra alterazioni di p53 e maggiore frequenza di recidiva (Carson C et al, 2012).

In conclusione, dal nostro studio è emerso che l' overespressione di marcatori di staminalità, l' assenza di proteina p16 e l' overespressione del marker di ipossia CA IX sono associati ad un fenotipo più aggressivo. Pertanto, l' introduzione di un pannello di anticorpi comprendenti almeno un marcatore per ognuna delle categorie testate potrebbe consentire di stratificare i pazienti con melanoma spesso in categorie di rischio ben definite, consentendo una sempre maggiore personalizzazione del management clinico.

Inoltre, la concordanza fra espressione di CA IX e markers di staminalità nel gruppo di pazienti ad alto rischio di progressione potrà prevedere importanti risvolti terapeutici, attraverso l'utilizzo di farmaci diretti contro CA IX concettualmente in grado di colpire la sottopopolazione staminale del tumore, con conseguente prevedibile abbattimento della chemio- e radio resistenza CSC-mediate.

## BIBLIOGRAFIA

Abd Elmageed ZY, Gaur RL, Williams M, Abdraboh ME, Rao PN, Raj MH, Ismail FM, Ouhtit A. Characterization of coordinated immediate responses by p16INK4A and p53 pathways in UVB-irradiated human skin cells. *J Invest Dermatol.* 2009 Jan;129(1):175-83.

Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, Pajares R, Martínez-Tello FJ, Hortelano CM, Piris MA, Rodríguez-Peralto JL. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol.* 2004 Jan;164(1):193-203.

Bartek J, Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* 2007;26:7773–7779.

Bartkova J, Lukas J, Guldberg P, Alsner J, Kirkin AF, Zeuthen J, Bartek J. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. *Cancer Res.* 1996 Dec 1;56(23):5475-83.

Bennett DC. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21:27–8.

Bowen AR, Hanks AN, Allen SM, Alexander A, Diedrich MJ, Grossman D. Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells. *J Invest Dermatol.* 2003;120(1):48–55.

Brantley MA Jr, Harbour JW. Inactivation of retinoblastoma protein in uveal melanoma by phosphorylation of sites in the COOH-terminal region. *Cancer Res* 2000; 60: 4320–3.

Brantley MA Jr, Harbour JW. Deregulation of the Rb and p53 pathways in uveal melanoma. *Am J Pathol* 2000; 157: 1795–801 (bis).



Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Pontén J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15;88(22):10124-8.

Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. (See comment.) *Nature* 1998; 391: 597–601.

Carson C, Omolo B, Chu H, Zhou Y, Sambade MJ, Peters EC, Tompkins P, Simpson DA, Thomas NE, Fan C, Sarasin A, Dessen P, Shields JM, Ibrahim JG, Kaufmann WK. A prognostic signature of defective p53-dependent G1 checkpoint function in melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012 Jul;25(4):514-26

Castellano M, Pollock PM, Walters MK, Sparrow LE, Down LM, Gabrielli BG, Parsons PG, Hayward NK. CDKN2A/p16 is inactivated in most melanoma cell lines. *Cancer Res*. 1997 Nov 1;57(21):4868-75.

Chazal M, Marionnet C, Michel L, Mollier K, Dazard JE, Della Valle V, Larsen CJ, Gras MP, Basset-Séguin N. P16(INK4A) is implicated in both the immediate and adaptative response of human keratinocytes to UVB irradiation. *Oncogene*. 2002 Apr 18;21(17):2652-61.

Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 2006;20:2149–2182.

Ching JA, Gould L. Giant scalp melanoma: a case report and review of the literature. *Eplasty*. 2012;12:e51.

Chitneni SK, Palmer GM, Zalutsky MR, and Dewhirst, MW. Molecular imaging of hypoxia. *J. Nucl. Med*. 2011; 52, 165–168.

Daniotti M, Oggionni M, Ranzani T, Vallacchi V, Campi V, Di Stasi D, Torre GD, Perrone F, Luoni C, Suardi S, Frattini M, Pilotti S, Anichini A, Tragni G, Parmiani G, Pierotti MA, Rodolfo M. BRAF alterations are

associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. *Oncogene*. 2004 Aug 5;23(35):5968-77.

Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE Jr, You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet*. 2009 May;41(5):544-52.

Dankort D, Filenova E, Collado M, Serrano M, Jones K, McMahon M. A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev*. 2007 Feb 15;21(4):379-84.

Darnton SJ. Demystified ... p53. *Mol Pathol* 1998; 51: 248–53.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.

Downward J. Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:11–22.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):817-25.

Fang, J.S.; Gillies, R.D.; Gatenby, R.A. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Seminars in cancer biology*, 2008, 18, (5), 330-337.

Fusi A, Ochsenreither S, Busse A, Rietz A, Keilholz U. Expression of the stem cell marker nestin in peripheral blood of patients with melanoma. *Br J Dermatol*. 2010 Jul;163(1):107-14.

Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004;6:313–9.

Gatenby RA, Gillies RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jan;8(1):56-61.

Georgantas RW 3rd, Streicher K, Luo X, Greenlees L, Zhu W, Liu Z, Brohawn P, Morehouse C, Higgs BW, Richman L, Jallal B, Yao Y, Ranade K. MicroRNA-206 induces G1 arrest in melanoma by inhibition of CDK4 and Cyclin D. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013 Nov 30.

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL (2001). Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non small cell lung cancer. *Cancer Res*. **61**, 7992-7998.

Gillies RJ, Verduzco D, and Gatenby RA. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat. Rev. Cancer*; 2012; 12, 487–493.

GLOBOCAN 2008 (n.d.). Available: <http://globocan.iarc.fr/>. Accessed 2014 Jan 20.

Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*. 2006 Jan;126(1):154-60.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 1996 Jan 4;379(6560):88-91.

Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *British Journal of Cancer* 2006;95:496–505.

Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2004;4:361–70.

Ha L, Merlino G, Sviderskaya EV. Melanomagenesis: overcoming the barrier of melanocyte senescence. *Cell Cycle*. 2008 Jul 1;7(13):1944-8.

Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38–47.

Hill LL, Ouhtit A, Loughlin S, Kripke ML, Ananthaswamy HN, Owen-Schaub LB. Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science*. 1999;285(5429):898–900.

Hocker T and Tsao H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat*. 2007; 28:578-588.

Hoogsteen IJ, Marres HA, Bussink J, van der Kogel AJ, Kaanders JH. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinomas: predictive value and clinical relevance of hypoxic markers. A review. *Head Neck*. 2007 Jun;29(6):591-604.

Houben R, Ortmann S, Drasche A, Troppmair J, Herold MJ, Becker JC. Proliferation arrest in B-Raf mutant melanoma cell lines upon MAPK pathway activation. *J Invest Dermatol*. 2009 Feb;129(2):406-14.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2013.

<http://www.registri-tmori.it/PDF/AIRTUM2007Sopravvivenza/053-AIRT2007melanoma.pdf>

IARC. Solar and Ultraviolet Radiation. vol. 55 of IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1992.

Ilardi G, Zambrano N, Merolla F, Siano M, Varricchio S, Vecchione M, De Rosa G, Mascolo M, Staibano S. Histopathological Determinants of Tumor Resistance: a Special Look to The Immunohistochemical Expression of Carbonic Anhydrase IX in Human Cancers. *Curr Med Chem*. 2013 Aug 23.

Jenkins NC, Liu T, Cassidy P, Leachman SA, Boucher KM, Goodson AG, Samadashwily G, Grossman D. The p16(INK4A) tumor suppressor regulates cellular oxidative stress. *Oncogene*. 2011 Jan 20;30(3):265-74.

Jubb, A.M.; Buffa, F.M.; Harris, A.L., Assessment of tumour hypoxia for prediction of response to therapy and cancer prognosis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2010, 14, (1-2), 18-29.

Kannan K, Sharpless NE, Xu J, O'Hagan RC, Bosenberg M, Chin L (2003) Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1221-5

Keller-Melchior R, Schmidt R, Piepkorn M. Expression of the tumor suppressor gene product p16INK4 in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 932-8.

Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 2006;127:265-275.

La Porta C. Cancer stem cells: lessons from melanoma. *Stem Cell Rev*. 2009 Mar;5(1):61-5.

Laga, A.C., Murphy, G.F., 2010. Cellular heterogeneity in vertical growth phase melanoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 134 (12), 1750–1757.

Lange-Carter CA, Johnson GL. Ras-dependent growth factor regulation of MEK kinase in PC12 cells. *Science* 1994;265:1458–61.

Le QT, Courter D. Clinical biomarkers for hypoxia targeting. *Cancer Metastasis Rev.* 2008 Sep;27(3):351-62.

Le QT, Denko NC, Giacca AJ. Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:293–310.

Lee N, Barthel SR, Schatton T. Melanoma stem cells and metastasis: mimicking hematopoietic cell trafficking? *Lab Invest.* 2014 Jan;94(1):13-30.

Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 1994; 371: 534–7.

Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Soon Lee C, Zhuang L, McCarthy SW, Scolyer RA. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology.* 2006 Aug;38(4):287-301.

Lin A, and Hahn SM. Hypoxia imaging markers and applications for radiation treatment planning. *Semin. Nucl. Med.* 2012; 42, 343–352.

Lock FE, McDonald PC, Lou Y, Serrano I, Chafe SC, Ostlund C, Aparicio S, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene.* 2013 Oct 31;32(44):5210-9.

Long GV, Wilmott JS, Capper D, Preusser M, Zhang YE, Thompson JF, Keeford RF, von Deimling A, Scolyer RA. Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of V600E BRAF mutation in melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2013 Jan;37(1):61-5

Mackie, R. M., Hauschild, A., and Eggermont, A. M. (2009). Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 20 Suppl 6, vi1-7.

Maelandsmo GM, Flørenes VA, Hovig E, Oyjord T, Engebraaten O, Holm R, Børresen AL, Fodstad O. Involvement of the pRb/p16/cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanomas. *Br J Cancer*. 1996 Apr;73(8):909-16.

Mandalà M, Voit C. Targeting BRAF in melanoma: biological and clinical challenges. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Sep;87(3):239-55.

Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol*. 1999; 155 (3), 739–752.

Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J*. 1995 Jul 3;14(13):3136-45.

Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):720-4.

Milligan A, Gabrielli BG, Clark JM, Hayward NK, Ellem KA. Involvement of p16CDKN2A in cell cycle delays after low dose UV irradiation. *Mutat Res*. 1998;422(1):43–53.

Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, Dérijard B, Davis RJ, Johnson GL, Karin M. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*. 1994 Dec 9;266(5191):1719-23.

Monahan KB, Rozenberg GI, Krishnamurthy J, Johnson SM, Liu W, Bradford MK, Horner J, Depinho RA, Sharpless NE. Somatic p16(INK4a) loss accelerates melanomagenesis. *Oncogene*. 2010 Oct 28;29(43):5809-17.

Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1037–1046.

Murphy GF, Wilson BJ, Girouard SD, Frank NY, Frank MH. Stem cells and targeted approaches to melanoma cure. *Mol Aspects Med*. 2013 Oct 19.

Neri D, Supuran CT. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature reviews. Drug discovery*, 2011, 10, (10), 767-777.

Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, Cros J, Faivre S, Raymond E. MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2014 Feb;141(2):160-71.

Ouhtit A, Gorny A, Muller K, Hill LL, Owen-Schaub L, Ananthaswamy HN (2000) Loss of fas-ligand expression in mouse KCs during UV carcinogenesis. *Am J Pathol* 157:1975–81

Ouhtit A, Muller HK, Davis D, Ullrich SE, Mc-Conkey D, Ananthaswamy HN. Temporal events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. *Am J Pathol*. 2000;156(1):201–207.

Pastorek J, Pastoreková S, Callebaut I, Mornon JP, Zelník V, Opavský R, Zát'ovicová M, Liao S, Portetelle D, Stanbridge EJ, et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene*. 1994 Oct;9(10):2877-88.

Pavey S, Conroy S, Russell T, Gabrielli B. Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer Res*. 1999;59(17):4185–4189.



Peris K, Chimenti S, Fargnoli MC, Valeri P, Kerl H, Wolf P. UV fingerprint CDKN2a but no p14ARF mutations in sporadic melanomas. *J Invest Dermatol.* 1999;112(5):825–826.

Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.* 2003 Jan;33(1):19-20.

Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, Bacon P, Panella J, Choubey D, Nickoloff BJ. Regulation of apoptosis by p53 in UV-irradiated human epidermis, psoriatic plaques and senescent keratinocytes. *Oncogene.* 2002 May 2;21(19):2991-3002.

Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007;26:3100–12.

Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res.* 1995 Jul 1;55(13):2713-8.

Schatton T, Frank MH. Antitumor immunity and cancer stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; 1176, 154–169. *Cancer Res.* 70 (2), 697–708.

Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004;116:235–246.

Shin HJ, Rho SB, Jung DC, Han IO, Oh ES, Kim JY. Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion. *Journal of cell science*, 2011, 124, (Pt 7), 1077-1087.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014 Jan;64(1):9-29.

Simard EP, Ward EM, Siegel R, Jemal A. Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:118-128.

Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ. p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol* 1998; 20: 255–61.

Straume O, Akslen LA. Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1997; 74: 535–9.

Supuran, C.T., Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature reviews. Drug discovery*, 2008, 7, (2), 168-181.

Swietach P, Patiar S, Supuran CT, Harris AL, Vaughan-Jones RD. The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular pH in three-dimensional tumor cell growths. *The Journal of biological chemistry*, 2009, 284, (30), 20299-20310.

Teicher BA. Acute and chronic in vivo therapeutic resistance. *Biochemical pharmacology*, 2009, 77, (11), 1665-1673.

Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *New England Journal of Medicine* 2004;351:998–1012.

Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* 2004;381:335–354.

Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin AH, Markl ID, Fountain JW. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 22: 157–63.

Weinberg RA. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81, 323- 330.

Wellbrock C, Karasaridis M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004;5:875–85.

Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control*. 2001;12(1):69–82.

Williams M, Ouhtit A. Towards a Better Understanding of the Molecular Mechanisms Involved in Sunlight-Induced Melanoma. *J Biomed Biotechnol*. 2005; 2005(1):57-61.

Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res*. 2000 Dec 15;60(24):7075-83

Yaswen P, Campisi J. Oncogene-induced senescence pathways weave an intricate tapestry. *Cell* 2007;128:233–234.

Young A, Lyons J, Miller AL, Phan VT, Alarcón IR, McCormick F. Ras signaling and therapies. *Adv Cancer Res*. 2009;102:1-17.

Yu H, McDaid R, Lee J, Possik P, Li L, Kumar SM, Elder DE, Van Belle P, Gimotty P, Guerra M, Hammond R, Nathanson KL, Dalla Palma M, Herlyn M, Xu X. The role of BRAF mutation and p53 inactivation during transformation of a subpopulation of primary human melanocytes. *Am J Pathol*. 2009 Jun;174(6):2367-77.

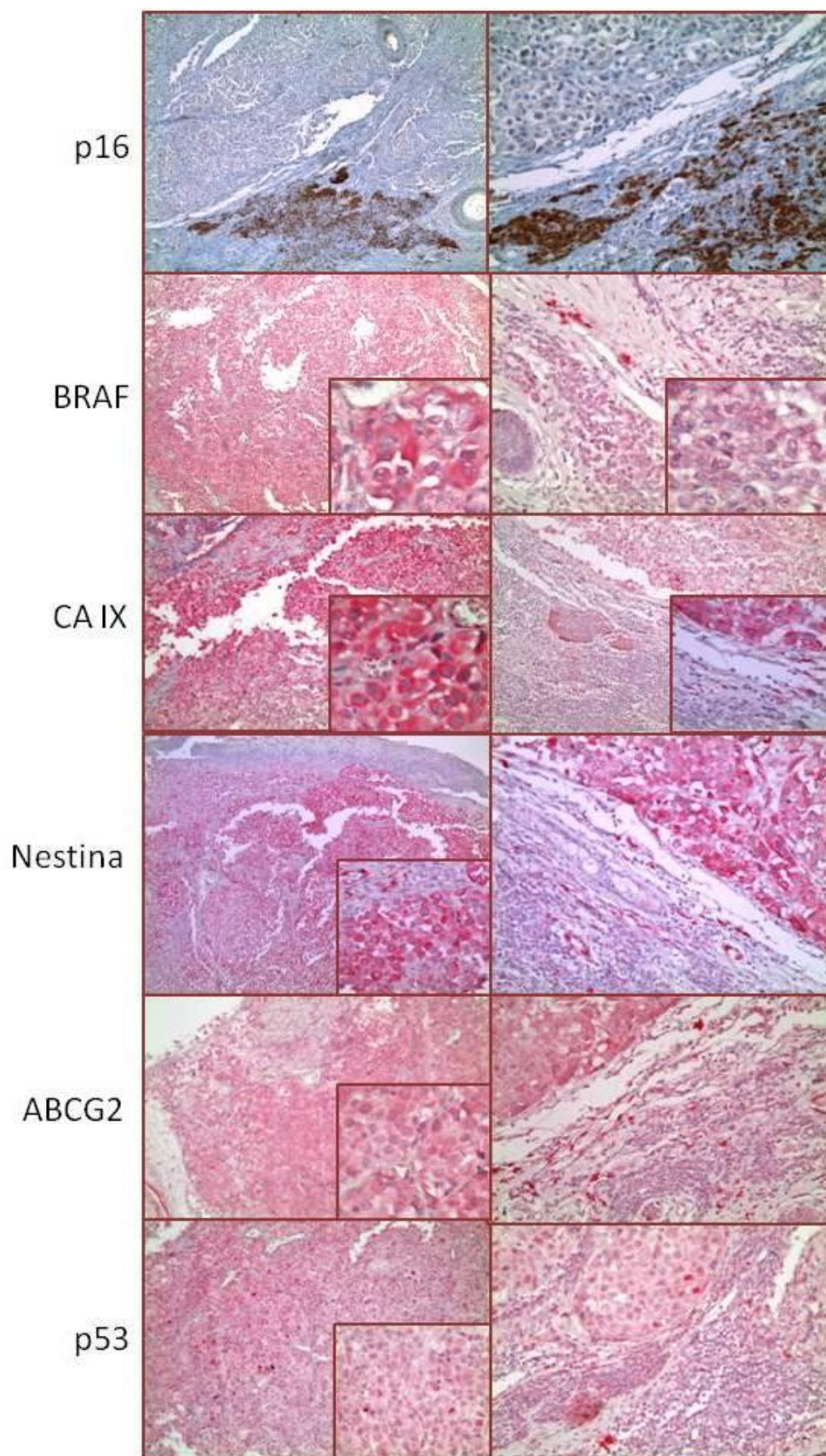
Zagzag J, Pollack A, Dultz L, Dhar S, Ogilvie JB, Heller KS, Deng FM, Patel KN. Clinical utility of immunohistochemistry for the detection of the BRAF v600e mutation in papillary thyroid carcinoma. *Surgery*. 2013 Dec;154(6):1199-204.

FIGURE

**Fig.1 Rappresentazione visiva dei risultati delle indagini immunohistochimiche nella popolazione studio**

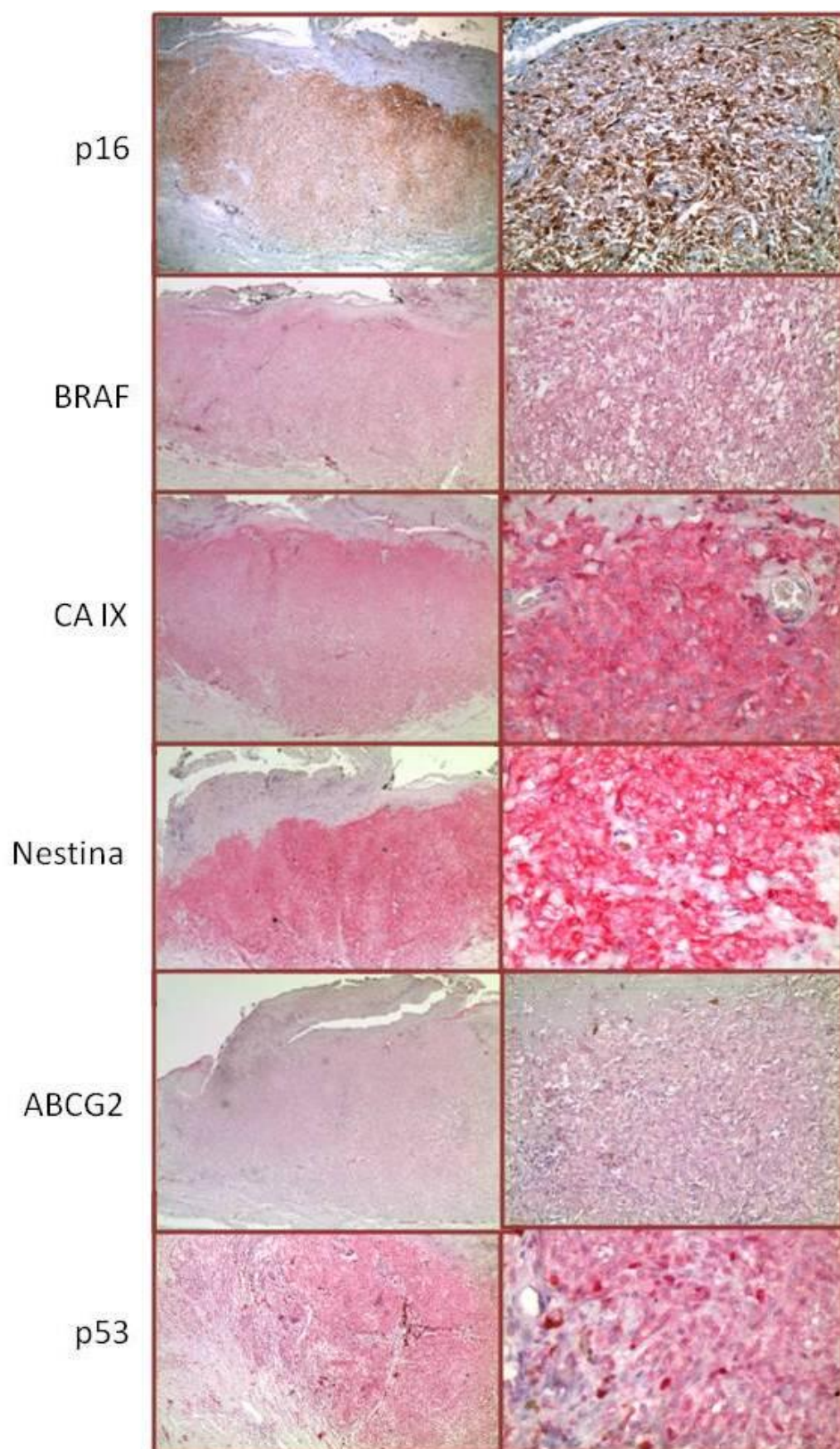
Patient	P16	Nestina	Nestina endotelio	CA IX	CA IX stroma	ABC G2	BRAF	p53	Rb
1	nd	positività	negatività	positività	nd	negatività	positività	nd	nd
2	positività	nd	nd	positività	nd	negatività	positività	negatività	nd
3	nd	positività	negatività	negatività	positività	negatività	positività	negatività	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	positività	positività	negatività	nd
5	nd	positività	negatività	positività	positività	positività	positività	nd	nd
6	nd	positività	positività	nd	positività	nd	nd	nd	nd
7	nd	negatività	positività	negatività	nd	negatività	negatività	nd	nd
8	nd	positività	positività	positività	nd	positività	positività	nd	negatività
9	nd	positività	positività	nd	nd	positività	positività	negatività	nd
10	nd	positività	positività	negatività	nd	positività	positività	nd	nd
11	nd	positività	negatività	positività	nd	negatività	negatività	nd	nd
12	nd	positività	negatività	nd	nd	negatività	positività	nd	nd
13	nd	positività	positività	negatività	negatività	positività	positività	negatività	nd
14	nd	positività	negatività	nd	nd	positività	positività	nd	nd
15	nd	positività	positività	negatività	nd	positività	positività	nd	nd
16	nd	positività	negatività	nd	negatività	positività	positività	negatività	nd
17	nd	negatività	positività	negatività	negatività	positività	positività	nd	negatività
18	nd	negatività	negatività	nd	nd	negatività	positività	nd	nd
19	nd	positività	positività	negatività	nd	positività	positività	nd	nd
20	nd	positività	positività	nd	nd	negatività	positività	nd	negatività
21	nd	positività	negatività	nd	negatività	negatività	positività	nd	negatività
22	nd	positività	positività	negatività	nd	positività	negatività	nd	nd
23	nd	positività	positività	nd	nd	positività	positività	nd	nd
24	nd	nd	nd	nd	nd	positività	positività	nd	nd
25	nd	negatività	negatività	nd	nd	positività	positività	nd	nd
26	nd	positività	negatività	negatività	nd	nd	positività	nd	negatività
27	nd	negatività	negatività	nd	nd	positività	positività	nd	nd
28	nd	positività	positività	nd	nd	negatività	positività	nd	nd
29	nd	positività	positività	negatività	nd	positività	positività	negatività	nd
30	nd	negatività	positività	nd	nd	negatività	positività	nd	nd
31	nd	negatività	positività	nd	nd	negatività	positività	nd	nd
32	nd	positività	negatività	negatività	nd	negatività	positività	negatività	nd
33	nd	nd	nd	nd	negatività	positività	positività	nd	negatività
34	nd	positività	positività	nd	nd	negatività	positività	nd	nd
35	nd	negatività	negatività	nd	negatività	negatività	positività	negatività	nd
36	nd	positività	negatività	nd	nd	negatività	positività	nd	nd
37	nd	positività	positività	nd	negatività	positività	positività	nd	nd
38	nd	positività	negatività	nd	nd	nd	nd	nd	nd
39	nd	positività	positività	nd	nd	positività	positività	nd	nd
40	nd	positività	negatività	nd	nd	positività	positività	nd	nd
41	nd	positività	negatività	nd	nd	positività	negatività	negatività	nd
42	nd	positività	negatività	nd	nd	positività	positività	nd	nd
43	nd	positività	negatività	negatività	nd	positività	negatività	nd	nd
44	nd	positività	negatività	nd	nd	negatività	positività	nd	nd
45	nd	positività	negatività	nd	nd	negatività	positività	negatività	nd
46	nd	nd	negatività	nd	nd	negatività	negatività	nd	nd
47	nd	positività	positività	negatività	nd	positività	positività	nd	nd
48	nd	positività	positività	nd	nd	negatività	positività	nd	nd
49	nd	negatività	positività	nd	nd	negatività	positività	nd	nd
50	nd	positività	negatività	nd	nd	positività	negatività	nd	nd
51	nd	negatività	negatività	nd	nd	positività	positività	nd	nd
52	nd	positività	negatività	negatività	nd	positività	negatività	nd	negatività
53	nd	positività	negatività	negatività	nd	negatività	negatività	nd	nd
54	nd	negatività	positività	negatività	nd	negatività	positività	nd	nd
55	nd	negatività	positività	nd	nd	positività	positività	nd	negatività

**Fig. 2** *Pannello delle colorazioni effettuate in un caso di melanoma con follow-up negativo (positività linfonodo sentinella e sviluppo di metastasi linfonodali, a distanza e morte per malattia) (Paziente n° 9)*





**Fig. 3** *Pannello delle colorazioni effettuate in un caso di melanoma con follow-up positivo (Paziente n°53)*





**Fig. 4** *Pannello delle colorazioni effettuate in un caso di melanoma gigante (Paziente n°1G)*

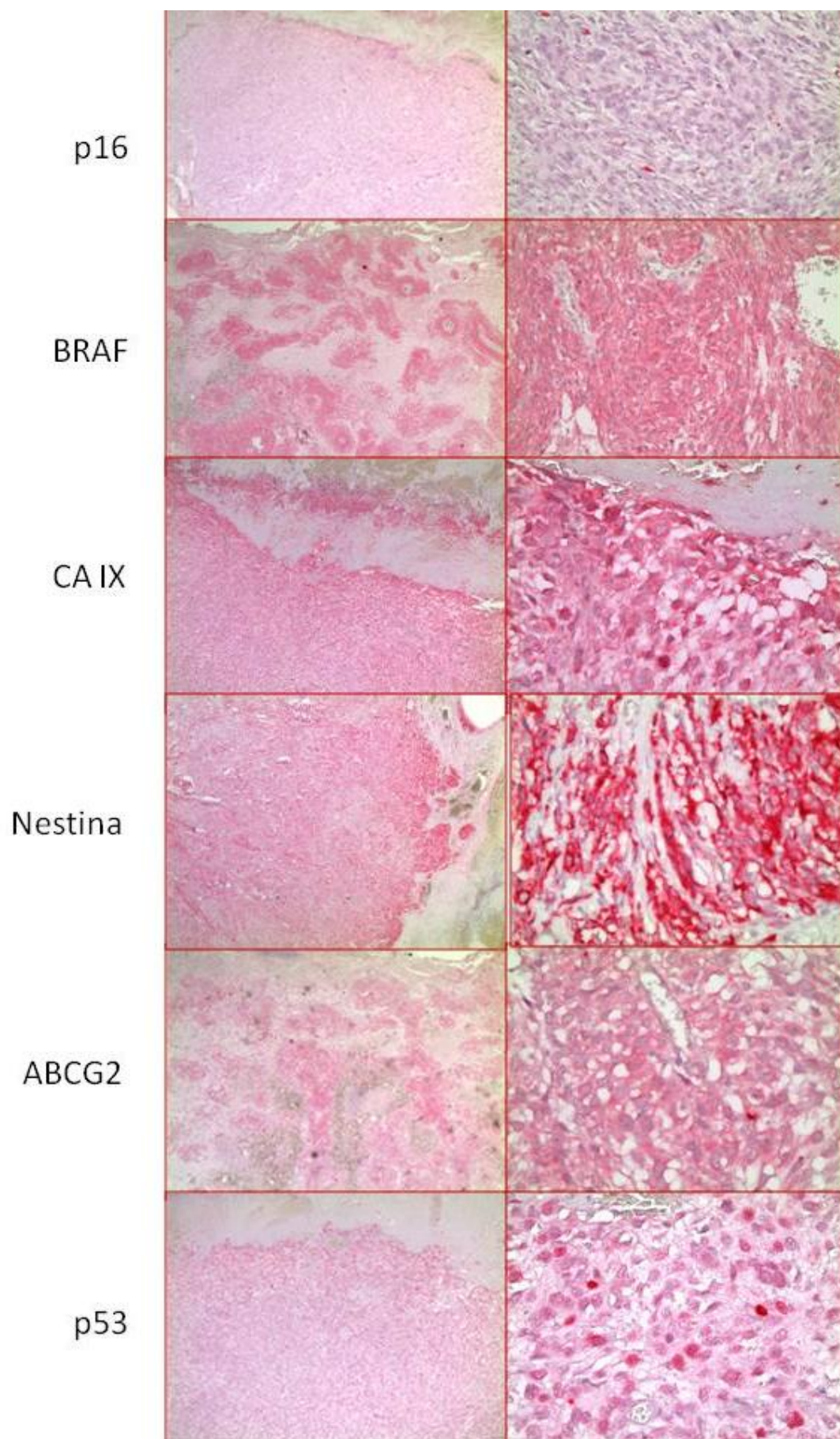




Fig. 5 Curve di sopravvivenza in relazione all' occorrenza di un evento avverso

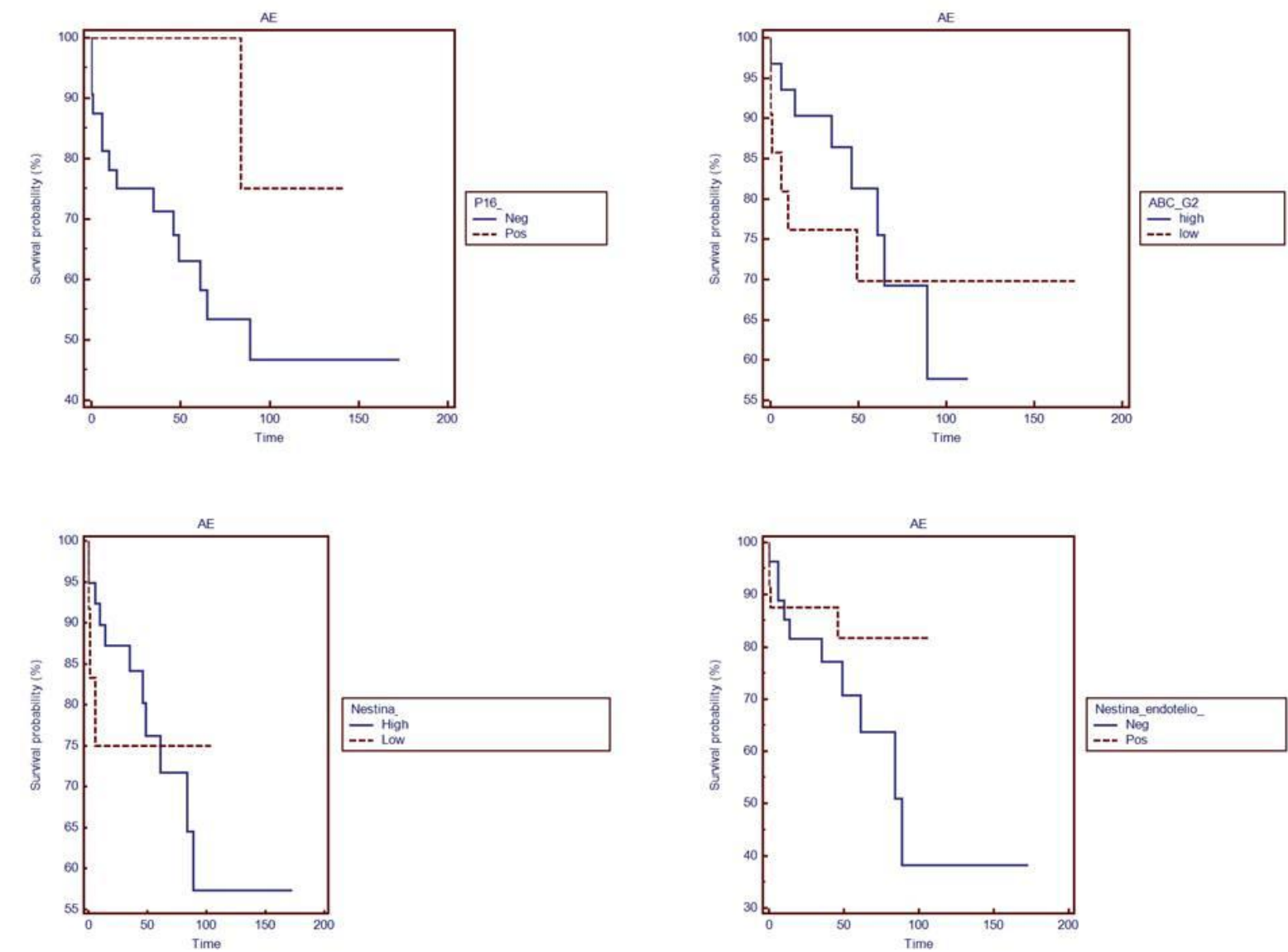


Fig. 5bis Curve di sopravvivenza in relazione all' occorrenza di un evento avverso

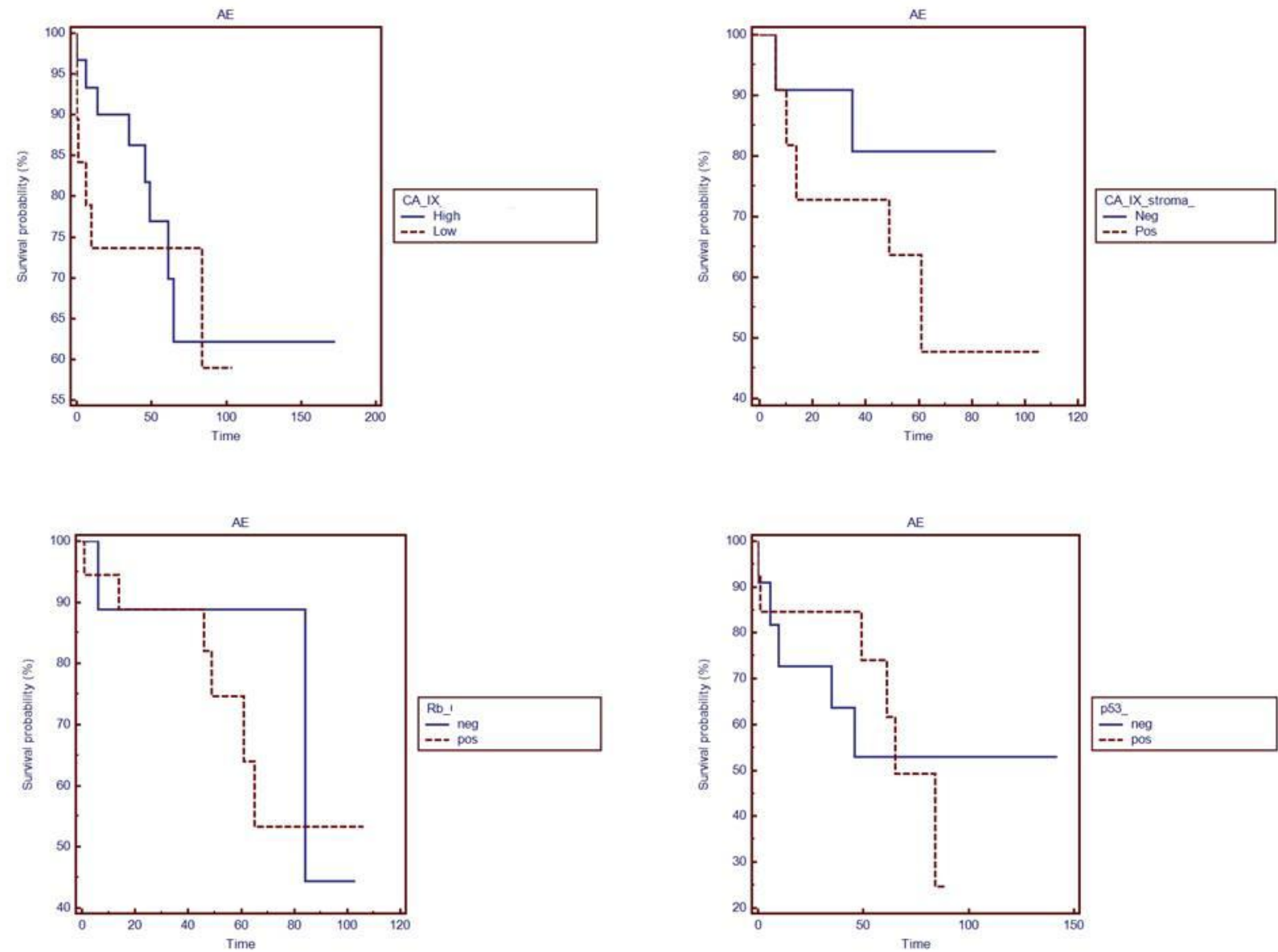
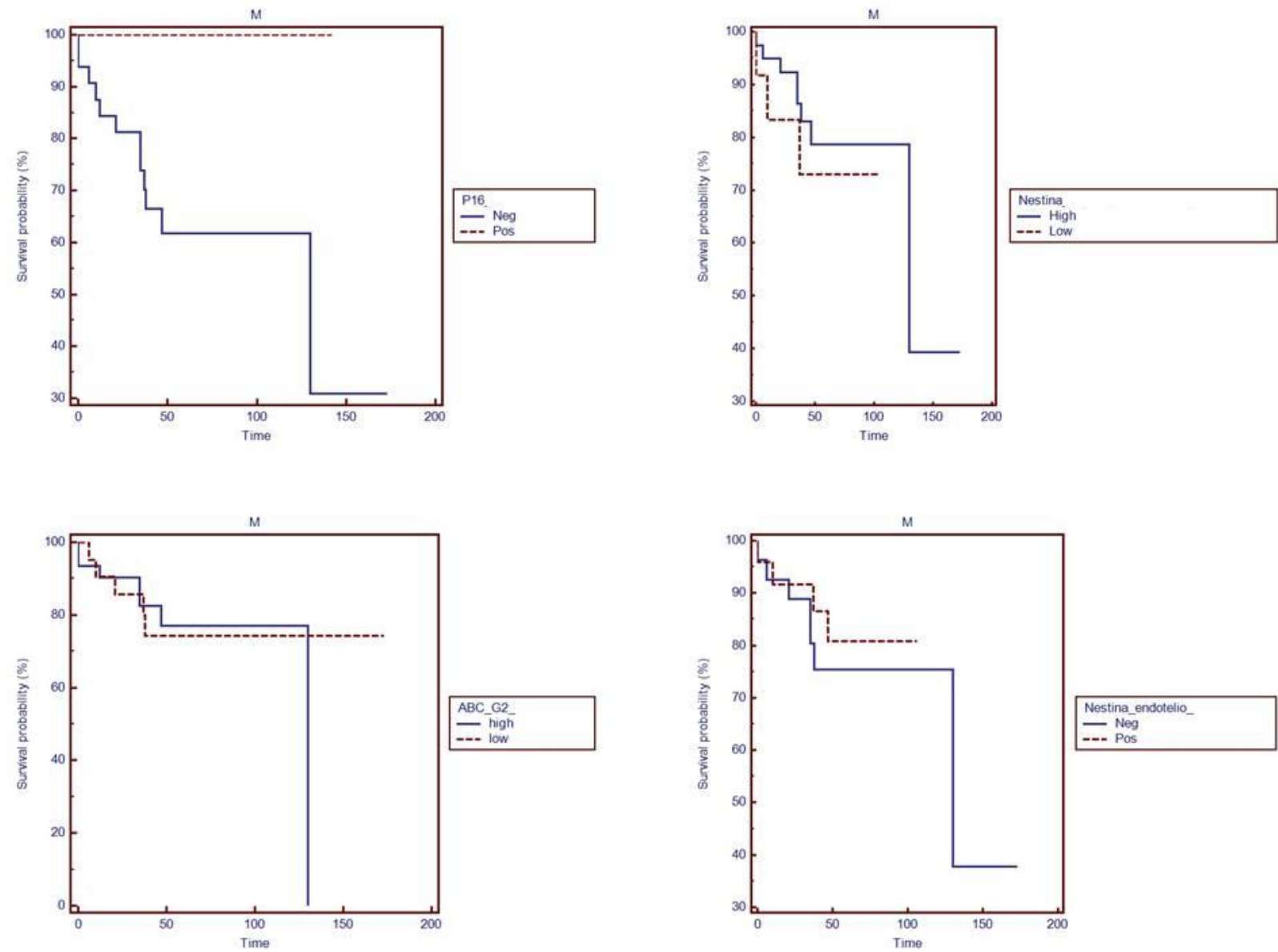
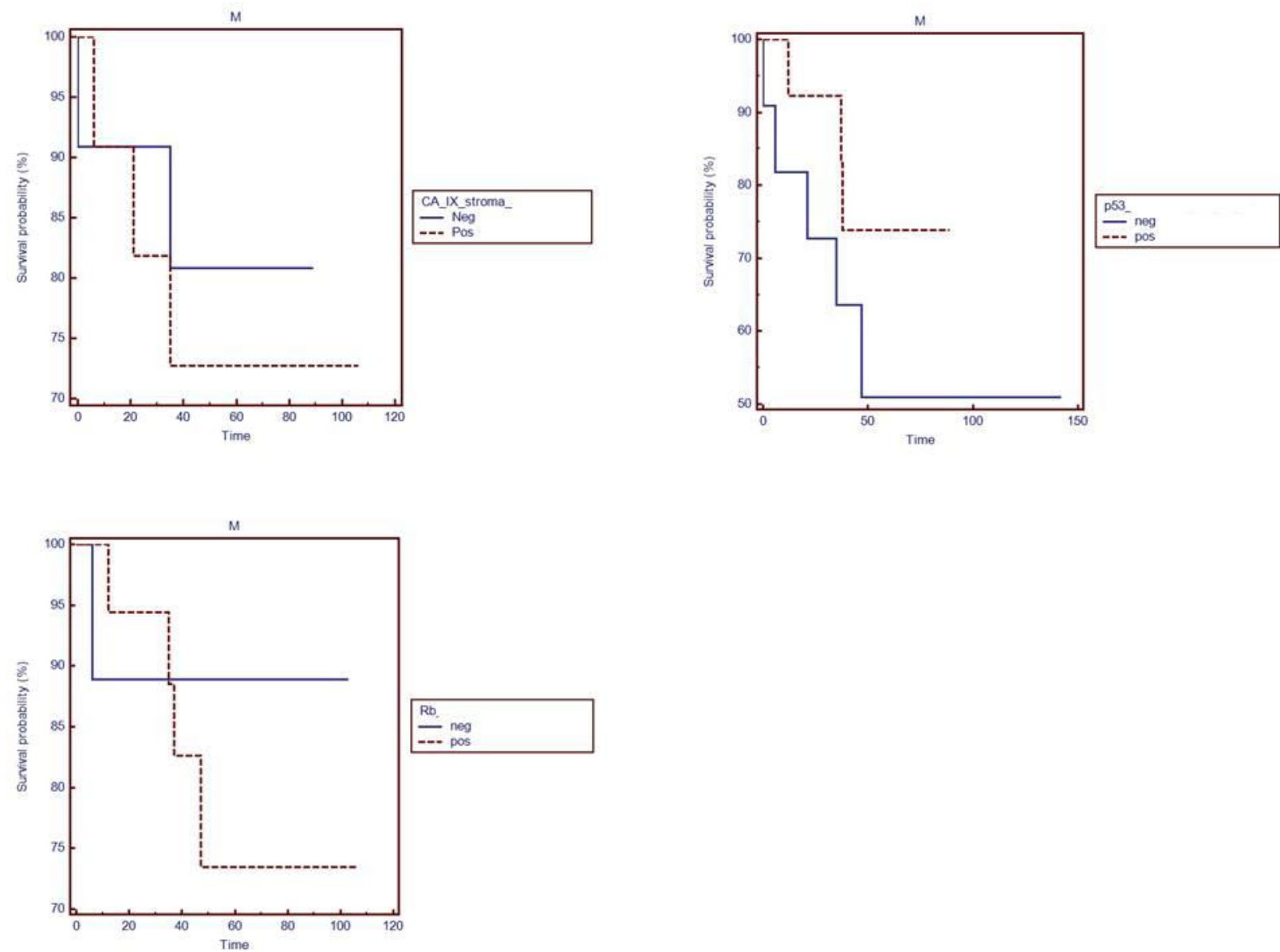


Fig. 6 Curve di sopravvivenza in relazione all' occorrenza di metastasi a distanza



**Fig. 6bis** *Curve di sopravvivenza in relazione all' occorrenza di metastasi a distanza*



**Fig. 7** Curve di sopravvivenza in relazione all' occorrenza di metastasi linfonodali

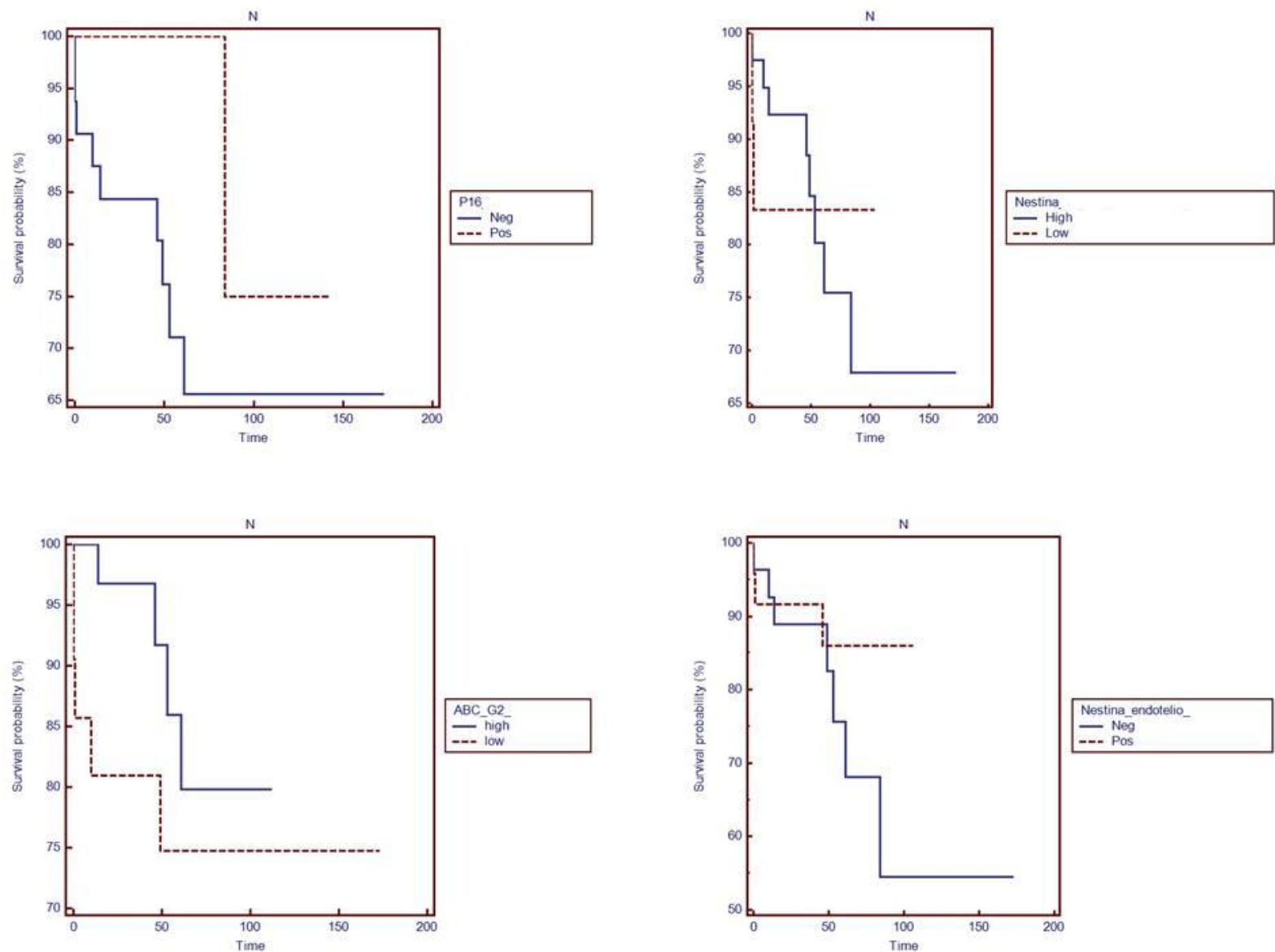
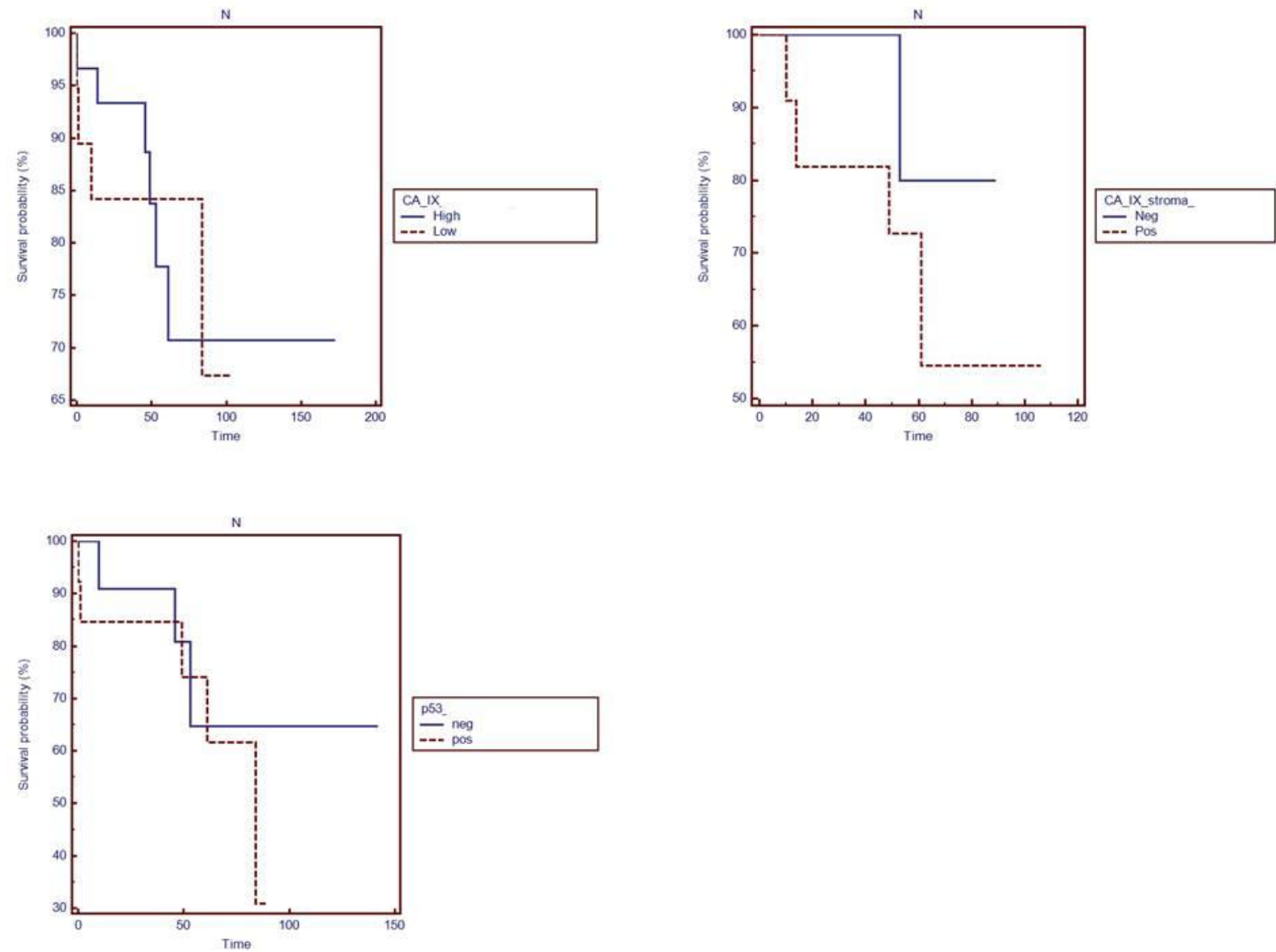


Fig. 7bis *Curve di sopravvivenza in relazione all' occorrenza di metastasi linfonodali*



## **TABELLE**

Tabella 1. Dati clinico-patologici della popolazione studio

Paziente	Età	Sesso	Sede	Breslow	Componente cellulare	Ulcerazione	Pregresso nevo	Mitosi	TIL	N(0)	FU parziale (mesi)	R (mesi)	N (mesi)	M (mesi)	D (mesi)	STAGE
1*	38	F	*	3	EPITELIOIDE	sì	no	*	NP	NEG		-	-			IIB
2*	43	M	GLUTEO	3	BALLONIFORME	no	no	>/=1	SCARSA	POS	129 M	-	-	-	-	IIIA
3	50	M	COSCIA SINISTRA	3	EPIT/FUS	no	no	<1	SCARSA	NEG		-	10	21	33	IIA
4*	61	M	BRACCIO SIN	3	EPIT/FUS	sì	no		NP	NEG		-	-	-	-	IIB
5**	55	F	SPALLA	2,55	EPIT	no	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	14;24	35	-	IIA
6	92	F	DORSO	3,6	NEVOIDI	no	no	>/=1	SCARSA	*		-	-	-	-	IIA
7*	64	M	REGIONE DELTOIDEA	8	BALL/FUS	no	no	<1	SCARSA	NEG	51, 70, 130, 153 S	-	-	-	-	IIB
8	45	F	GAMBA SIN	2,2	NEV/EPIT	sì	no	<1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIB
9	35	M	REGIONE TEMPORALE SIN	2,55	EPITELIOIDE	sì	no	>/=1	SCARSA	POS		-	46	47	48	IIIB
10	72	F	ALLUCE PIEDE SINISTRO	5,5	EPITELIOIDE	sì	no	>/=1	SCARSA	POS		-	-	-	-	IIIB
11*	63	F	REGIONE LOMBARE	5	NEVOIDE	no	no	*	NP	NEG		-	-	-	-	IIB
12	46	F	COSCIA SIN	2,55	EPIT/FUS	no	no	>/=1	PRESENTE	NEG	6 A	-	-	-	-	IIA
13	65	F	DORSO	4,5	FUSATA	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIC
14	73	M	SPALLA DX	2,4	FUS/EPIT	no	no	>/=1	SCARSA	NEG	15, 16 M	-	-	130	-	IIA
15	49	M	ALLUCE PIEDE DESTRO	>18	EPIT/FUS/NEV	sì	no	*	SCARSA	*		-	-	-	-	IIC
16	66	M	TORACE	2,9	EPITELIOIDE	sì	no	>/=1	SCARSA	POS		-	-	-	-	IIIB
17**	45	M	GAMBA DX	3,2	EPITELIOIDE	sì	no	>/=1	SCARSA	POS		-	-	-	-	IIIB
18**	31	F	DORSO	2,6	EPITELIOIDE	no	no	<1	PRESENTE	NEG		-	-	-	-	IIA
19**	64	M	REGIONE DORSALE DX	>10	FUS/EPIT	sì	no	<1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIC
20	40	M	FIANCO SIN	3,5	EPITELIOIDE	sì	no	<1	SCARSA	NEG	11 M	-	-	-	-	IIB
21	47	M	PIANTA PIEDE DX	2,5	EPIT	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIB
22*	74	M	TRONCO	3,9	EPITELIOIDE	sì	no	>/=1	SCARSA	*		-	-	-	-	IIB
23	47	M	REGIONE SCAPOLARE SIN	2,5	EPITELIOIDE	no	no	>/=1	PRESENTE	NEG		-	-	-	-	IIA
24*	22	M	DORSO	3	EPIT	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	12	-	IIB
25	65	M	REGIONE ASCELLARE SX	3,7	EPIT/FUS	no	no	>/=1	SCARSA	NEG	100 S	-	-	-	-	IIA
26*	71	M	FIANCO DESTRO	2	EPIT	no	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	84	-	-	IB
27	65	M	FIANCO SIN	2,9	EPIT/FUS	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIB
28	56	M	TORACE	5,6	EPITELIOIDE	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG	3 M, 16 A	-	-	-	-	IIC
29	74	F	GAMBA SINISTRA	2,2	EPIT/FUS	sì	no	>/=1	SCARSA	POS		-	-	0	-	IV
30	43	M	GAMBA SINISTRA	2,25	EPIT/BALL/RAB	no	no	>/=1	SCARSA	POS		-	1	37, 43, 50	65	IIIA
31	83	F	GAMBA DX	>4	EPIT	no	no	>/=1	NP	*		-	-	-	-	IIB



<b>32*</b>	53	F	GAMBA DX	4,8	EPIT/FUS	sì	no	>/=1	SCARSA	POS		-	-	6	-	IIIB
<b>33</b>	54	M	GAMBA SIN	3,1	EPITELIOIDE	sì	no	>/=1	PRESENTE	NEG		-	-	-	-	IIB
<b>34*</b>	36	F	DORSO	3,8	EPIT	no	no	>/=1	SCARSA	NEG	<b>25 A</b>	-	-	-	-	IIA
<b>35</b>	91	M	CUOIO CAPELLUTO	4	EPIT/NEV	no	no	>/=1	SCARSA	*		-	-	-	-	IIA
<b>36</b>	70	M	GAMBA DX	>5	EPIT/FUS	no	no	>/=1	SCARSA	POS		-	49		-	IIIA
<b>37</b>	67	F	GAMBA SINISTRA	2,8	EPIT/FUS	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIB
<b>38</b>	73	M	PIEDE DX	2,7	EPITELIOIDE	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIB
<b>39**</b>	81	F	PIEDE DX	8,5	FUS/EPIT	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIC
<b>40**</b>	73	F	SOVRASCAPOLARE DX	5,35	EPITELIOIDE	no	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIB
<b>41**</b>	73	F	DORSO	3,35	FUS/EPIT	no	no	>/=1	SCARSA	*		-	53	35	56	IIA
<b>42</b>	56	M	TORACE	3,35	EPITELIOIDE	no	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	61	-	-	IIA
<b>43</b>	84	M	REGIONE TEMPORALE SX	5,6	FUS/EPIT	sì	no	>/=1	SCARSA	*	<b>14 A</b>	-	-	-	-	IIC
<b>44</b>	65	M	GAMBA DX	2,7	FUSATE	no	no	>/=1	SCARSA	*	<b>3, 26 S</b>	-	0	38 ; 60	-	IIA
<b>45</b>	86	M	V DITO PIEDE DX	3,6	FUS/EPIT	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIB
<b>46*</b>	77	M	SPALLA SX	2,8	EPIT/FUS	sì	sì	>/=1	SCARSA	NEG	<b>4 S, 37 A, 39, 41 S, 54 M, 85 S, 94 S</b>	-	-	-	-	IIB
<b>47</b>	78	M	I DITO MANO DX	2,1	FUS/EPIT	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIB
<b>48</b>	61	F	DORSO	3	EPITELIOIDE	no	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIA
<b>49</b>	43	M	SPALLA	2,4	FUS/EPIT	no	no	>/=1	SCARSA	POS	<b>22 M</b>	-	-	-	-	IIIA
<b>50**</b>	78	F	PIEDE DX	10,6	EPITELIOIDE	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIC
<b>51</b>	49	M	TORACE	2,45	EPIT/FUS/BALL	no	no	>/=1	SCARSA	POS		6, 24	-	0	-	IIA
<b>52*</b>	98	F	GUANCIA DX	6,6	EPITELIOIDE	no	no	>/=1	PRESENTE	*		-	-	-	-	IIB
<b>53</b>	50	F	COSCIA SX	3,1	FUS/EPIT	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG		-	-	-	-	IIB
<b>54</b>	56	F	DORSO	3,95	EPITELIOIDE	no	no	>/=1	SCARSA	POS		-	0,11,12	10, 23	-	IIIA
<b>55*</b>	70	M	SPALLA	2,5	EPITELIOIDE	sì	no	>/=1	SCARSA	NEG	<b>0 A, 7 S, 37, 47 M S</b>	-	-	-	-	IIB

\*= NODULARE    \*\*= POLIPOIDE

R= recidiva; N= metastasi linfonodali; M= metastasi a distanza; D= morte

In follow-up parziale: M= altra lesione di natura melanocitaria; S= altra lesione su base attinica; A= altri tipi di neoplasia

**Tabella 2. Dati clinico – patologici dei casi di melanoma gigante**

Caso n°	Età	Sesso	Sede	Dimensioni (cm)	Breslow	Componente cellulare	Ulcerazione	Nevo	Mitosi	Reazione intratumorale	N(0)	Follow-up (mesi)	R	N	M	D	STAGING
1G	53	M	GLUTEO	13,5	50	EPITELIOIDE	Sì	NO	1 - 6	SCARSA		138	-	-	-	-	
2G	63	M	IPOCONDRIODX	9	11	EPIT/FUS	Sì	NO	5	FOCALMENTE BRISK	*	6	-	-	-	-	
3G	77	M	CUOIO CAPELLUTO	9	16	FUSATA	Sì	NO	>1	*	*	6	5	-	-	-	

Tabella 3. Descrizione dei risultati dello studio immunohistochimico in rapporto ai dati clinico – patologici

		BRAF		p16		p53		pRb		nestina		ABCG2		CA IX	
		POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	HIGH	LOW
Sede	Fotoesposta	61,11%	12,96%	7,50%	70,00%	41,67%	37,50%	51,85%	22,22%	52,94%	19,61%	44,23%	30,77%	40,82%	30,61%
	Non fotoesposta	22,22%	3,70%	12,50%	10,00%	12,50%	8,33%	14,81%	11,11%	23,53%	3,92%	15,38%	9,62%	20,41%	8,16%
Componente cellulare	Mista	37,04%	9,26%	7,50%	40,00%	25,00%	29,17%	29,63	7,41%	33,33%	13,73%	28,85%	19,23%	26,53%	20,41%
	Non mista	46,30%	7,41%	12,50%	40,00%	29,17%	16,67%	37,04%	25,93%	43,14	9,8%	30,77%	21,15%	34,69%	18,37%
Ulceration	Assente	40,74%	7,41%	50,00%	5,00%	25,00%	16,67%	29,63%	7,41%	31,37%	17,65%	19,23%	26,92%	30,61%	14,29%
	Presente	42,59%	9,26%	30,00%	15,00%	29,17%	29,17%	37,04%	25,93%	45,10%	5,88%	40,38%	13,46%	30,61%	24,49%
Mitosi	<1	38,00%	10,00%	5,41%	35,14%	22,73%	18,18%	37,04%	11,11%	35,42%	14,58%	27,08%	22,92%	34,78%	15,22%
	=/>1	46,00%	6,00%	16,22%	43,24%	31,82%	27,27%	29,63%	22,22%	39,58%	10,42%	33,33%	16,67%	26,09%	23,91%
TIL	Scarsa	76,47%	13,73	21,05%	73,68%	56,52%	43,48%	62,96%	25,93%	69,39%	22,45%	55,10%	34,69%	53,19	38,30%
	Moderata	7,84	1,96	0,00%	5,26%	0,00%	0,00%	3,70%	7,41%	6,12%	2,04%	6,12%	4,08%	6,38%	2,13%
N(0)	Negativo	62,22%	11,11%	15,63%	46,88%	36,84%	21,05%	47,83%	26,09%	61,90%	11,90%	45,45%	27,27%	51,22%	19,51%
	Positivo	26,67%	0,00%	6,25%	31,25%	15,79%	26,32%	17,39%	8,70%	14,29%	11,90%	13,64%	13,64%	12,20%	17,07%
Tipologia	Nodulare/Polipoide	25,93%	12,96%	5,00%	27,50%	20,83%	16,67%	18,52%	18,52%	27,45%	7,84%	23,08%	15,38%	22,45%	14,29%
	Altro	57,41%	3,70%	15,00%	52,50%	33,33%	29,17%	48,15%	14,81%	49,02%	15,69%	36,54%	25,00%	38,78%	24,49%
FU parziale	Negativo	59,26%	11,11%	15,00%	60,00%	41,67%	33,33%	48,15%	25,93%	58,82%	11,76%	48,08%	21,15%	36,73%	32,65%
	Positivo	24,07%	5,56%	5,00%	20,00%	12,50%	12,50%	18,52%	7,41%	17,65%	11,76%	11,54%	19,23%	24,49%	6,12%
Follow-up	Negativo	57,41%	14,81%	17,50%	45,00%	29,17%	25,00%	44,44%	25,93%	54,90%	17,65%	44,23%	28,85%	44,90%	26,53%